

SÉRIE A, N° 3040

N° D'ORDRE :

3912

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Katy STENGER-HAFFEN

1^{re} THÈSE. — Etude des besoins nutritifs des gonades embryonnaires d'Oiseau
cultivées en milieux synthétiques.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 14 juin 1957 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN, *Président.*
COUTEAUX, $\left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\}$ *Examineurs.*
JOST,

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1958

SÉRIE A, N° 3040

N° D'ORDRE :

3912

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Katy STENGER-HAFFEN

1^{re} THÈSE. — Etude des besoins nutritifs des gonades embryonnaires d'Oiseau
cultivées en milieux synthétiques.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 14 juin 1957 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN,	{	<i>Président.</i>
COUTEAUX,		<i>Examineurs.</i>
JOST,		



MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VI^e)

1958

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	CUVILLIER	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
E. DARMOIS	T Enseign. de Physique.	JUNG	T Pétrographie.
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale.	WIEMANN	T Chimie org. structurale.
De BROGLIE	T Théories physiques.	JACQUINOT	T Spectroscopie et phy- sique céleste.
JOB	T Chimie générale.	VASSY	Physique de l'atmosph.
PRENANT	T Anat. et Histol. comp.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
GARNIER	T Géométrie supérieure.	M. PRUVOST	T Géologie.
PÉRÈS	T Mécanique des fluides et applications.	AMIEL	T Chimie (P. C. B.).
LAUGIER	T Physiologie générale.	HOCART	T Minéralogie.
M. CURIE	T Physique (P. C. B.).	J.-P. MATHIEU	T Physique (P. C. B.).
BARRABÉ	T Géologie structurale et géologie appliquée.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique mathémat.	MAY	T Biologie animale (P.C.B.).
Jacques BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique.	CHOQUET	T Calcul différent. et intégr.
PLANTEFOL	T Botanique.	FELDMANN	T Biologie (P. C. B.).
GRASSÉ	T Evol. des êtres organisés.	GUINIER	T Physique (P. C. B.).
PRÉVOST	T Chimie organique.	JOST	T Biologie animale (P.C.B.).
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	FORTET	T Calcul des probabilités.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	SCHWARTZ	T Méth. math. de la phys.
WYART	T Minéralogie.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
TEISSIER	T Zoologie.	MALAVARD	T Aviation.
MANGENOT	T Biologie végétale.	BRELOT	T Calcul différentiel.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	NORMANT	T Chimie (P. C. B.).
MONNIER	T Physiol. des fonctions.	BENARD	T Chimie (P. C. B.).
PIVETEAU	T Géologie.	BUVAT	T Botanique (E. N. S.).
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	DUGUE	T Statistique mathémat.
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	GÉLOSO	T Chimie (S. P. C. N.).
LAFFITTE	T Chimie générale.	SOULAIRAC	T Psychophysologie.
FAVARD	T Mécanique générale.	ULRICH	T Physiologie végétale.
COULOMB	T Physique du Globe.	MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).	KIRRMANN	T Théories chimiques.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	CHADEFAUD	Botanique.
P. DRACH	T Zoologie.	DESTRIAU	Physique (M. P. C.).
KASTLER	T Physique.	M ^{lle} LE BRETON	Physiologie générale.
EPHRUSSI	T Génétique.	SALEM	T Mathématiques générales.
WURMSER	T Biol. physico-chimique.	LEONG	T Mathématiques générales.
RIVIÈRE	T Géologie (S. P. C. N.).	DEVILLERS	T Anat. et histol. comp.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	EHRESMANN	T Tcologie algébrique.
LUCAS	T Recherches physiques.	FRANÇON	Physique (M. P. C.)
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	GLANGEAUD	T Géogr. phys. et géol. dyn.
ARNULF	T Optique appliquée.	GODEMENT	T Mathématiques (M. P. C.).
MAX MORAND	T Physique.	PISOT	T Calcul des probabilités.
SOLEILLET	T Physique.	E. ROCH	Géologie.
FORTIER	T Mécán. expér. des fluides.	SCHATZMANN	Astrophysique.
DANJON	T Astronomie.	TERMIER	T Paléontol. stratigraph.
FROMAGEOT	T Chimie biologique.	ZAMANSKY	T Mathémat. générales.
LAPORTE	T Physique générale et Ra- dioactivité.	JOLIO	T Phys. nucl. et radioact.
JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LENNUIER	Physique (P. C. B.).
PETIT	T Biologie maritime.	RIZET	Génétique.
QUENEY	T Météorologie et dyna- mique atmosphérique.	M ^{me} TONNELAT	Théories physiques.
GALLIEN	T Embryologie.	DIXMIER	Mathématiques (M. P. C.).
EICHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).	SOUCHAY	Chimie (P. C. B.).
De CUGNAC	T Biologie végétale (P.C.B.).	AIGRAIN	Physique (P. C. B.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.	BRUSSET	Chimie (P. C. B.).
THELLIER	T Physique du Globe.	M. LÉVY	Physique théorique.
AUDUBERT	T Electrochimie.	LENORMANT	Physiologie.
L'HÉRITIER	T Génétique.	M ^{me} CHAIX	Chimie biologique.
GRIVET	T Radio-Electricité.	M ^{me} HUREL-PY	Biol. végétale (P. C. B.).
PONCIN	T Mécanique des fluides.	PIAUX	Chimie (P. C. B.).
THIERY	T Mécanique appliquée.	BRUN	Mécán. expér. des fluides.
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.	LEDERER	Chimie biologique.
QUELET	T Chimie organique.	M ^{me} DUBREIL	
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.	JACOTIN	Mathématiques.
CHAMPETIER	T Chimie macromolécül.	M ^{me} LELONG	
		FERRAND	Mathématiques (E. N. S.).
		BELLAIR	Géologie (S. P. C. N.).
		COTTE	T Physique (M. P. C.).
		J. DUBOIS	Chimie.
		LAMOTTE	Zoologie.
		LE ROLLAND	Mécanique des fluides.
		MICHEL	Chimie (P. C. B.).

Secrétaire général CH. MONIER.

ÉTUDE DES BESOINS NUTRITIFS DES GONADES EMBRYONNAIRES D'OISEAU CULTIVÉES EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Par KATY STENGER-HAFFEN

(Laboratoire d'Embryologie expérimentale du Collège de France et du C. N. R. S.)

SOMMAIRE

<i>Introduction et position du problème.....</i>	522
<i>I. — Matériel et méthodes.....</i>	523
<i>II. — Culture de gonades en milieu standard naturel.....</i>	528
A. Différenciation sexuelle des gonades de l'embryon de Canard.....	528
B. Développement des gonades embryonnaires de Poulet.....	531
C. Croissance des gonades cultivées en milieu standard. Etude faite chez l'embryon de Poulet.....	534
<i>III. — Culture de gonades en milieux synthétiques.....</i>	536
A. Explantation de gonades sur le substratum de base dépourvu de glucose et d'extrait d'embryon.....	536
B. Explantation de gonades sur le substratum de base additionné de glucose	536
C. Explantation de gonades en milieux synthétiques composés de glu- cose et d'acides aminés.....	537
D. Problème de la croissance des gonades embryonnaires en culture in vitro en milieux synthétiques.....	550
<i>IV. — Etude des besoins en acides aminés des gonades embryonnaires d'Oiseau</i>	553
A. Etude préliminaire.....	553
B. Elaboration d'un milieu minimum favorable au développement des gonades embryonnaires	554
C. Amélioration du milieu minimum 46 chez l'embryon de Poulet....	567
D. Amélioration du milieu 50 chez l'embryon de Canard.....	571
<i>V. — Etude des besoins en hydrates de carbone des gonades de l'embryon de Canard cultivées en milieu synthétique.....</i>	576
A. Rôle du glucose.....	576
B. Essais de remplacement du glucose par d'autres glucides.....	577

VI. — Etude des besoins en vitamines des gonades embryonnaires d'Oiseau cultivées en milieux synthétiques.....	584
A. Influence des vitamines sur la croissance des gonades explantées sur le milieu C/2.....	585
B. Influence de l'acide folique et du mélange V ₂ sur la différenciation des gonades mâles de l'embryon de Canard explantées sur le milieu 50	587
VII. — Etude de l'action des hormones sexuelles cristallisées sur la différenciation sexuelle des gonades de l'embryon de Canard cultivées en milieux synthétiques.....	589
A. Action des hormones femelles	590
B. Action des hormones mâles.....	597
VIII. — Conclusions générales.....	600
Résumé	603

INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLÈME

Une nouvelle méthode de culture d'organes, inaugurée en 1951-1952 par mon maître, M. le P^r ETIENNE WOLFF, à l'élaboration de laquelle il a bien voulu m'associer, a permis d'élucider le problème de la différenciation des gonades embryonnaires d'Oiseau soustraites à l'influence de l'organisme. Les résultats ont montré que les gonades indifférenciées ont en elles, au stade du prélèvement, les facteurs de leur différenciation.

En 1953, M. ETIENNE WOLFF montra l'avantage que présentait cette technique pour l'étude des besoins nutritifs des organes embryonnaires. Il préconisait la substitution à l'extrait d'embryon, seul élément complexe du milieu, de substances de constitution chimique définie, ce qui revenait à remplacer le milieu « naturel » par un milieu « synthétique ». Si des milieux synthétiques permettent le développement des organes, il est possible de déceler quelles substances en sont responsables.

L'utilisation de milieux synthétiques, introduite par WHITE, en 1946, n'a été appliquée jusqu'à ce jour qu'à des cultures histiotypiques. Les recherches continuées depuis lors dans cette voie ont été très nombreuses, mais les résultats acquis n'ont été que partiels. Il convient de remarquer tout de suite que le but des recherches des cultures histiotypiques est très différent de celui des cultures organotypiques. En effet, les premières tendent à réaliser une prolifération intense et une survie illimitée des cellules. Ceci ne peut se réaliser que par l'apport d'un grand nombre de substances nutritives. Les meilleurs résultats et les derniers en date ont été obtenus par l'école de PARKER, en 1954-1956, et par celle de EARLE, en 1956. Ces auteurs ont obtenu une survie prolongée de plusieurs mois et une prolifération intense des cellules sur des milieux dépourvus de tout extrait de tissus embryonnaires ou adultes. Les secondes, qui tendent

à maintenir l'intégrité d'un organe pendant un temps limité, peuvent vraisemblablement se contenter de milieux moins complexes et exigent de moindres concentrations en substances nutritives, comme ETIENNE WOLFF l'a mis en lumière.

Mon maître, M. le P^r ETIENNE WOLFF, a confié simultanément à trois chercheuses de son laboratoire, M^{me} EM. WOLFF, M. KIENY et moi-même, l'étude des besoins nutritifs de trois catégories d'organes embryonnaires d'Oiseau : la syrinx, le tibia et les glandes génitales. Chacune d'entre nous a eu pour tâche particulière la recherche des facteurs responsables du développement d'un organe donné. Mon maître m'a confié l'analyse des besoins spécifiques de la différenciation sexuelle et de la croissance des gonades embryonnaires de Canard et de Poulet.

Je me fais une grande joie de lui exprimer ici ma profonde gratitude. Depuis le jour où il m'offrit d'entrer dans son laboratoire, il n'a cessé d'être pour moi un guide et un conseiller de tous les instants, m'encourageant à persévérer quand mes travaux semblaient piétiner, partageant mon enthousiasme quand les résultats répondaient à mes espoirs. Je le remercie de m'avoir témoigné sa confiance en m'associant à ses travaux d'élaboration de la méthode de culture d'organes. Pour l'enseignement qu'il m'a donné, pour la confiance et la sollicitude qu'il m'a apportées à toutes les étapes de mon travail, je voudrais lui réitérer ici ma très vive admiration et ma profonde reconnaissance.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les recherches ont été effectuées sur les glandes génitales d'embryons de Poulet et de Canard.

Les œufs de poule de la race « Leghorn blanche » provenaient de la région de Haguenau (Bas-Rhin).

Les œufs de cane des races « Khaki Campbell » et « Pékin » ont été fournis par l'élevage du laboratoire ou provenaient des environs de Strasbourg et de la région parisienne.

Les œufs frais sont incubés dans une couveuse réglée à la température de 38°.

Le stade des embryons a été déterminé par la durée de l'incubation. Les gonades embryonnaires de Poulet et de Canard ont été prélevées entre 7 et 11 jours d'incubation.

A. — MÉTHODE DE CULTURE EN MILIEU SYNTHÉTIQUE

La méthode de culture en milieu synthétique dérive de la méthode de culture en milieu standard (ET. WOLFF et K. HOFFEN, 1951 *a*-1952 *a*; ET. WOLFF, 1953; ET. WOLFF, K. HOFFEN, M. KIENY, EM. WOLFF, 1953).

1° COMPOSITION DES DIFFÉRENTS MILIEUX

Milieu T_[O].

Gélose à 1 % préparée dans du liquide de Gey sans glucose	6 parties.
Liquide de Tyrode (1) sans glucose.....	3 parties.

Milieu T.

Gélose à 1 % préparée dans du liquide de Gey.....	6 parties.
Liquide de Tyrode.....	3 parties.

Milieux synthétiques.

Gélose à 1 % préparée dans du liquide de Gey.....	6 parties.
Solution d'acides aminés dans du liquide de Tyrode (SAT)	3 parties.

Milieux synthétiques vitaminés.

Gélose à 1 % préparée dans du liquide de Gey.....	6 parties.
Solution d'acides aminés + vitamines dans du liquide de Tyrode (SATV).....	3 parties.

2° PRÉPARATION DES DIFFÉRENTES SOLUTIONS

QUI ENTRENT DANS LA COMPOSITION DES MILIEUX SYNTHÉTIQUES

a) *Solution de gélose* (2). — 10 g d'agar-agar sont dissous dans 1 litre de liquide de Gey.

b) *Liquide de Tyrode* (3). — Le liquide de Tyrode sert, d'une part, à la dissection des embryons et au prélèvement des organes et, d'autre part, à la confection des milieux standard et T. Nous préparons le liquide de Tyrode suivant la technique préconisée par CAMERON (1950).

Les sels et le glucose, à l'exception du bicarbonate de sodium, sont dissous dans 950 cm³ d'eau bidistillée (solution A). Le bicarbonate de sodium est dissous dans 150 cm³ d'eau bidistillée (solution B). Les deux solutions sont stérilisées séparément à l'autoclave. Au moment de l'emploi, on reconstitue le liquide de Tyrode en mélangeant les deux solutions après leur refroidissement complet.

c) *Solutions synthétiques à base d'acides aminés (SAT)*. — Dans nos expériences en collaboration avec ET. WOLFF, EM. WOLFF et M. KIENY (1953), nous avons employé deux mélanges d'acides aminés :

1° Un mélange de 9 acides aminés, avec lequel FISCHER (1941) et JENSEN (1948) ont tenté la culture de cellules en milieux synthétiques.

(1) Pour augmenter les garanties d'asepsie, de la solution de spécilline-subtosoan est incorporée au liquide de Tyrode qui entre dans la composition du milieu à raison de 3 gouttes pour 50 cm³. Ainsi, la quantité de sel de Na de pénicilline G, incorporée au milieu synthétique, correspond environ à 10 unités Oxford. Des expériences témoins ont montré que cette dose est inactive au point de vue nutritif.

Spécilline-subtosoan : 200 000 unités Oxford de sel de Na de pénicilline G dans 10 cm³ de polyvinylpyrrolidone.

(2) La bacto-agar nous est fournie par les laboratoires Difco, Detroit, Michigan.

(3) Les sels et le glucose des liquides de Gey et de Tyrode proviennent des laboratoires Merck, Darmstadt, à l'exception du PO₄H₂Na qui nous est fourni par Prolabo, Paris.

Des essais de culture préliminaires nous ont amenés à utiliser, pour les gonades, la solution additionnée d'un volume égal de Tyrode. Nous appelons la solution correspondante solution B/2. Dans nos premières expériences, nous avons remplacé la cystine par une quantité égale de cystéine. Ultérieurement, nous avons été amenés à doubler cette dose pour la culture des gonades. La solution, que nous dénommons toujours B/2, a la composition suivante :

L (+) lysine 2 HCl	30,2 mg
L (+) arginine base	15,4 »
DL-méthionine	5,2 »
DL-histidine HCl	6,2 »
Acide L (+) glutamique	28,2 »
Acide DL-aspartique	11,8 »
L (—) proline	10,2 »
L (—) cystéine HCl	6 »
L (—) tryptophane	10 »
Liquide de Tyrode	100 cm ³

2° Un mélange contenant 21 acides aminés choisis dans les milieux synthétiques utilisés par MORGAN, MORTON et PARKER (1950), WHITE (1946), WAYMOUTH (1951), parmi les constituants considérés comme essentiels pour la croissance des organismes par ROSE (1938) et, enfin, parmi ceux reconnus par EARLE (1952), dans les ultrafiltrats d'extrait d'embryon ou de sérum.

Cette solution, que nous avons dénommée « C » (ET. WOLFF, K. HAFEN, M. KIENY et EM. WOLFF, 1953), est additionnée d'un volume égal de Tyrode pour la culture des gonades. De même que dans le cas de la solution B/2, nous avons doublé la dose initiale de cystéine. La composition de la solution C/2 est la suivante :

L (+) lysine 2 HCl	30,2 mg
L (+) arginine base	15,4 »
DL-méthionine	5,2 »
DL-histidine HCl	6,2 »
Acide L (+) glutamique	28,2 »
Acide DL-aspartique	11,8 »
L (—) proline	10,2 »
L (—) cystéine HCl	6 »
L (—) tryptophane	10 »
DL-phénylalanine	14 »
L (—) leucine	18 »
DL-isoleucine	20 »
DL-thréonine	24 »
DL-valine	28 »
Glycocolle	5 »
L (—) tyrosine	2 »
L (—) hydroxyproline	5 »
DL-sérine	25 »
Taurine	10 »
Ornithine 2 HCl	10 »
L (—) asparagine	10 »
Liquide de Tyrode	100 cm ³

Les solutions d'acides aminés sont préparées dans du liquide de Tyrode. Afin d'éviter la stérilisation des acides aminés en présence des sels et du glucose, la solution A du Tyrode (950 cm³) est divisée en 2 parties : les sels et le glucose sont dissous dans 760 cm³ d'eau bidistillée (solution TC); la quantité d'eau

bidistillée restante (190 cm³) est réservée à la dissolution des acides aminés et des vitamines (solution TA ou TAV).

Les solutions TC et TA sont stérilisées séparément à l'autoclave. La solution TC peut être conservée à la glacière à + 4° pendant une période n'excédant pas 8 jours. La solution TA est préparée quelques heures avant son utilisation. Nous préconisons l'emploi de solutions d'acides aminés dans 50 cm³ de Tyrode, 50 cm³ d'une solution SAT peuvent être ainsi décomposés :

7 cm³ de solution B (CO₃ H Na);
34,4 cm³ de solution TC;
8,6 cm³ de solution TA.

Au moment de la préparation des milieux, les 3 solutions sont réunies dans le flacon qui contient la solution TA.

d) *Solution d'acides aminés + vitamines (1) (SATV)*. — Les solutions synthétiques vitaminées ont été préparées de la même manière que précédemment. On répartit 50 cm³ d'eau bidistillée en 4 parties :

7 cm³ de solution B (CO₃ H Na);
34,4 cm³ de solution TC;
7,6 cm³ de solution TA;
1 cm³ de solution de vitamine.

Le centimètre cube de la solution de vitamine est prélevé dans une solution mère de vitamine dans de l'eau bidistillée dont la concentration varie de 1 mg à 0,001 mg par litre, selon la concentration finale désirée. Les solutions mères de vitamines n'ont pas été stérilisées à l'autoclave. Les pesées et les dilutions ont été effectuées aseptiquement. Au moment de la préparation des milieux, les quatre solutions sont réunies dans le flacon qui contient la solution TA.

Dans le cas des vitamines liposolubles, les solutions mères de vitamines ont été préparées suivant la technique préconisée par MORGAN, MORTON et PARKER (1950), dans laquelle intervient de l'alcool à 95° et une solution aqueuse à 5 % de Tween 80. Les concentrations des solutions mères de vitamines liposolubles varient de 40 000 U. I. à 0,04 U. I. de *vitamine D* (ergocalciférol) par litre, et de 300 000 U. I. à 0,03 U. I. de *vitamine A* (acétate) par litre.

e) *Modification du substratum de base et d'une solution synthétique pour l'étude des hydrates de carbone (2)*. — Le substratum de base est constitué de gélose préparée dans du liquide de Gey dépourvu de glucose. On remplace le glucose de la solution TC par le glucide à étudier.

Les concentrations des hydrates de carbone éprouvés varient de 1,11 mM/l à 55,6 mM/l. Nous appelons mM/l la concentration en milli-molécule-gramme par litre.

f) *Solution d'hormones sexuelles cristallisées (3)*. — Nous avons ajouté des hormones sexuelles cristallisées à un milieu synthétique selon deux procédés déjà employés dans un travail antérieur (ET. WOLFF et K. HAFFEN, 1952) :

1° Le benzoate d'œstradiol et le propionate de testostérone sont dissous dans de l'huile d'olive neutre stérile, à raison de 5 mg par cm³.

(1) Les acides aminés et les vitamines nous sont fournis par les laboratoires Hoffmann-La Roche, Paris.

(2) Les hydrates de carbone proviennent des laboratoires Merck, Darmstadt.

(3) Les hormones sexuelles cristallisées proviennent des Laboratoires Français de Chimiothérapie, Paris.

Le milieu synthétique hormoné a la constitution suivante :

Gélose à 1 % dans du liquide de Gey.....	6 parties.
Solution SAT	3 parties.
Hormone en solution huileuse.....	1 partie.

2° Le dipropionate d'œstradiol, le sel de Na de l'acide n-bis-déhydrodoisynolique et le propionate de testostérone sont ajoutés à la solution d'acides aminés stérile avec toutes les précautions d'asepsie. Les doses utilisées varient de 0,3 à 0,5 mg par cm³.

Un tel milieu synthétique hormoné a la composition suivante :

Gélose à 1 % dans du liquide de Gey.....	6 parties.
Solution SAT + hormone.....	3 parties.

3° PRÉPARATION DES MILIEUX

La préparation des milieux synthétiques s'effectue selon la technique mise au point par Et. WOLFF et par moi-même (1952 *a*). Le principe est le suivant :

Toutes les opérations sont effectuées dans les conditions d'asepsie requises pour les cultures d'organes.

Les milieux sont préparés dans des godets à micrographie du type « salière » (capacité 4 à 5 cm³). La gélose, chauffée au bain-marie à la température de 70° à 80°, est versée au compte-gouttes dans le récipient. On ajoute la solution synthétique. Les constituants sont mélangés par agitation à l'aide d'une baguette de verre. On laisse le milieu refroidir et se solidifier avant de luter le récipient à la paraffine très chaude.

Le milieu synthétique présente une consistance, une élasticité et une humidité analogues au milieu standard.

4° PRÉLÈVEMENT DES ORGANES ET PRÉPARATION DES EXPLANTS

La technique de culture d'organes ayant été mise au point sur les glandes génitales d'embryons d'Oiseau, le prélèvement des gonades et la préparation des explants ont déjà été décrits dans des publications antérieures (Et. WOLFF et K. HAFFEN, 1952 *a* et *b*).

5° LAVAGES ET REPIQUAGES

Les cultures sont contrôlées tous les jours. 24 ou 48 heures après l'explantation, un lavage des organes s'impose. Le lavage des explants est effectué avec du liquide de Tyrode. Cette opération est répétée toutes les fois qu'elle se révèle nécessaire.

B. --- MICROMÉTHODE DE DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Pour la mesure de la croissance des gonades cultivées *in vitro*, nous nous sommes adressés à l'ultramicrométhode du dosage de l'azote total, adaptée par R. VENDRELY (1947). Cette méthode a déjà été éprouvée au laboratoire par D. SCHEIB-PFLEGER (1955). Elle utilise l'appareil de Markham pour la distillation et l'ultramicroburette de Linderstrom-Lang pour la titration.

Les dosages ont été effectués sur des testicules d'embryons de Poulet de 7 1/2 à 11 jours d'incubation.

Les témoins, prélevés au départ de la culture, sont minéralisés immédiatement et conservés pendant la durée de l'explantation des organes en expérience. Les dosages des témoins et des organes en expérience sont effectués le même jour.

Pour faire une appréciation quantitative de l'évolution des gonades en explantation *in vitro*, nous nous basons, pour calculer le pourcentage de variation (gain ou perte) de l'azote total, sur la relation suivante :

$$\% \text{ gain (ou perte) N total} = \frac{\text{N gagné ou perdu}}{\text{N départ}} \times 100.$$

Le calcul des erreurs et la précision de la méthode ont été déterminés. Les calculs ont montré que, pratiquement, les erreurs sont de l'ordre de ± 2 à 3 %. Nous nous accordons une marge de sécurité de 5 %. Par conséquent, tout gain ou perte d'azote total ne peut être considéré comme significatif que lorsqu'il dépasse 5 %.

C. — MESURE DU pH DES MILIEUX DE CULTURE

Les mesures du pH des milieux de culture ont été effectuées à l'aide du pH mètre de Heito. On amène à la surface du milieu de culture une électrode adaptée à la mesure du pH de la surface d'un gel. Des mesures quotidiennes ont été faites pendant toute la durée de la culture.

D. — MÉTHODE HISTOLOGIQUE

Fixation et coloration. — Les gonades fixées dans du liquide de Bouin ont été débitées en coupes transversales d'une épaisseur de 5 μ et colorées au glyché-malun-éosine.

II. — CULTURE DE GONADES EN MILIEU STANDARD NATUREL

Nous rappellerons les expériences fondamentales qui ont montré le développement des gonades embryonnaires de Canard et de Poulet cultivées sur le milieu à base d'extrait embryonnaire (ET. WOLFF et K. HAFFEN, 1951 a, b-1952 a, b, c).

A. — DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD

La différenciation sexuelle se situe entre la fin du 9^e et le début du 10^e jour de l'incubation.

Au stade du prélèvement (7 à 8 jours), les gonades de Canard sont encore sexuellement indifférenciées. Morphologiquement, elles ont la même structure dans les deux sexes. Elles se présentent sous la forme de

deux languettes qui s'appliquent, par toute leur surface interne, sur le mésonephros.

Au point de vue histologique, les gonades gauches sont constituées de cordons médullaires très serrés, sans structure définie, qu'entoure un épithélium unistratifié à cellules hautes. Les deux constituants de la gonade renferment des gonocytes. Les gonades droites ont la même structure, mais l'épithélium est plus mince et plus aplati (fig. 1).

24 à 48 heures après l'explantation, on assiste à une évolution diver-

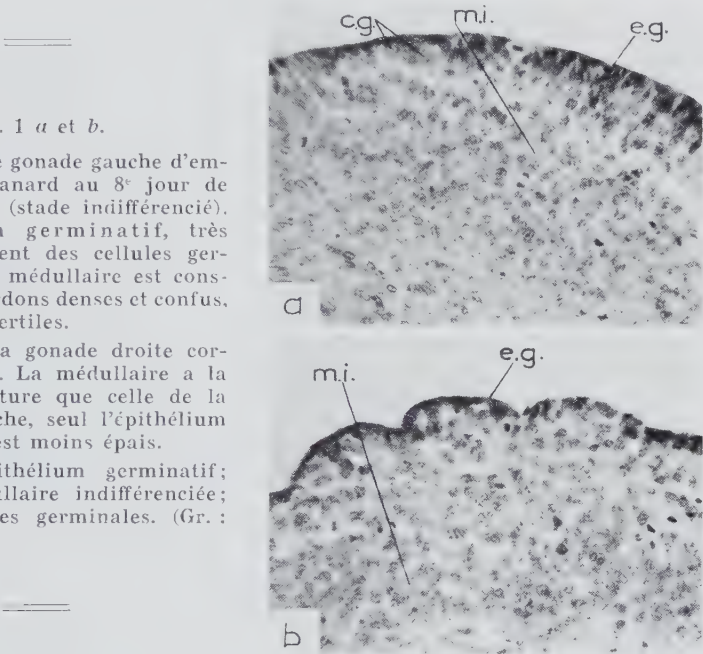


FIG. 1 *a* et *b*.

a. Détail d'une gonade gauche d'embryon de Canard au 8^e jour de l'incubation (stade indifférencié). L'épithélium germinatif, très épais, contient des cellules germinales. La médullaire est constituée de cordons denses et confus, également fertiles.

b. Détail de la gonade droite correspondante. La médullaire a la même structure que celle de la gonade gauche, seul l'épithélium germinatif est moins épais.

e. g., épithélium germinatif;
m. i., médullaire indifférenciée;
c. g., cellules germinales. (Gr.:
× 270.)

gente et caractéristique des explants, suivant qu'ils donnent naissance à des testicules, à des ovaires ou à des gonades droites ♀.

Les testicules se développent en boyaux renflés, grossièrement cylindriques, très semblables à ceux d'un embryon normal. Après 5 jours de culture, ils contiennent, sous une albuginée plus ou moins développée, des ampoules testiculaires typiques à l'intérieur desquelles on rencontre des spermatogonies au repos ou en mitose. Certains explants sont partiellement ou complètement stériles (fig. 2).

Les gonades génétiquement femelles évoluent d'une manière très différente des gonades mâles.

Les ovaires gauches s'aplatissent sur le substratum et s'entourent d'une large frange transparente. Le centre de l'organe est occupé par des gra-

nulations réfringentes. Au point de vue histologique, le cortex comprend plusieurs assises de cellules prismatiques à noyaux orientés perpendiculairement à la surface. Il est séparé de la médullaire par une membrane basale très nette, souvent interrompue par des proliférations corticales sous forme de nids à ovogonies. La médullaire, très réduite, est formée

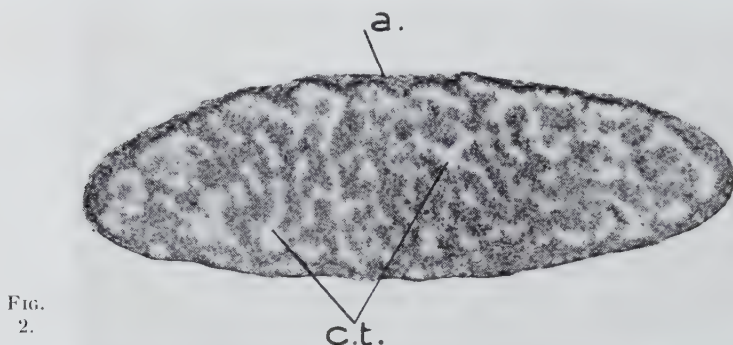


FIG.
2.

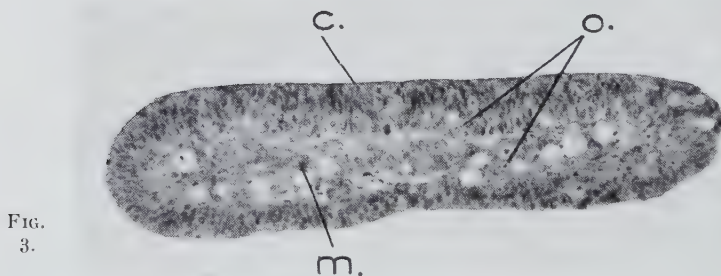


FIG.
3.

FIG. 2. — Gonade gauche d'embryon de Canard explantée au 8^e jour de l'incubation, cultivée pendant 10 jours sur le milieu standard naturel. Structure testiculaire caractéristique. Explant partiellement stérile. (D'après ET. WOLFF et K. HAFFEN, 1952.)

c. t., cordon testiculaire; *a.*, albuginée. (Gr. : $\times 115$.)

FIG. 3. — Aspect général d'un ovaire d'embryon de Canard, prélevé au 8^e jour de l'incubation, cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard naturel. Le cortex épais entoure complètement la médullaire constituée de cordons diffus et lacunaires. Des ovogonies, isolées ou groupées en îlots, occupent presque toute l'épaisseur de l'organe.

c., cortex; *m.*, médullaire; *o.*, ovogonies. (Gr. : $\times 150$.)

de cordons sans structure définie, tantôt serrés, tantôt lacunaires (fig. 3). On y voit de nombreuses vacuoles arrondies qui contiennent des débris cellulaires et qui correspondent à des cellules germinales dégénérées.

Comme dans le cas des explants testiculaires, certains ovaires sont stériles.

Les gonades droites femelles se présentent sous la forme de petites languettes granuleuses et plates, non frangées. Elles montrent une importante prolifération de cellules périphériques. Le centre de l'organe diminue de taille d'une manière régulière. Ces organes subissent, *in vitro*, une régression analogue à la régression normale. La structure de ces gonades rappelle celle de la médullaire d'un ovaire : sous un épithélium à cellules aplaties, plus développé à certains endroits, on rencontre des cordons plus ou moins lâches. Les cellules germinales sont nombreuses et certaines, déjà dégénérées, subsistent sous forme de grosses vacuoles.

B. — DÉVELOPPEMENT DES GONADES EMBRYONNAIRES DE POULET

La différenciation sexuelle des gonades de l'embryon de Poulet se situe au 9^e jour de l'incubation. Les gonades ont été prélevées à 7 et 8 jours d'incubation. Le sexe des embryons devient prévisible à partir du 8^e jour de l'incubation. Le critère est basé sur la différenciation morphologique des gonades : symétrie ♂ et légère asymétrie ♀. En coupe, la distinction est plus difficile (fig. 4 et 5). Chez l'embryon ♂, l'épithélium germinatif est moins épais qu'aux stades précédents. Sous cet épithélium, limité par une membrane, se trouve une zone de tissu mésenchymateux qui deviendra l'albuginée du testicule. Les cordons médullaires forment un réseau de cordons qui sont encore dépourvus d'une lumière et entre lesquels s'insinuent des travées conjonctives. Chez l'embryon ♀, l'épithélium germinatif est plus épais, la limite profonde est ondulée, la couche conjonctive est inégalement développée. Les cordons médullaires ne sont pas délimités et les travées conjonctives ne se distinguent pas nettement (d'après FIRKET, 1914 et 1920).

L'aspect extérieur des gonades se modifie peu de temps après l'explication. On observe deux types de différenciation morphologique des gonades. Les unes prennent la forme de boyaux cylindriques, souvent fuselés, d'aspect translucide : elles ont l'apparence de testicules. Lorsque la gonade gauche se développe ainsi, la gonade droite subit la même évolution. Les autres s'aplatissent sur le milieu et s'entourent d'une frange transparente : elles ont l'apparence d'ovaires. Cependant, les gonades droites correspondantes ne subissent pas de régression aussi nette que les gonades droites de Canard. Elles ont l'aspect de petits testicules plus ou moins aplatis.

Les gonades gauches et droites du type mâle ont, dans la plupart des cas, la structure de testicules typiques. Chez certaines gonades gauches, l'épithélium germinatif n'a pas complètement disparu. Il persiste à l'état de lambeaux peu élevés. On observe souvent des cordons testiculaires en rapport avec eux ou qui s'ouvrent à l'extérieur (fig. 6).

L'étude histologique révèle une différenciation aberrante des gonades ♀. Elles n'ont pas la structure d'ovaires. Ce sont des ovotestis. Le cortex, en

général bien développé, est bourré d'ovogonies. Sa structure est normale. La médullaire est massive et de structure mâle. Elle est formée de cordons testiculaires très différenciés. On y trouve encore des cellules germinales. La zone de lacunes, qui est présente chez l'embryon normal, est extrêmement réduite chez ces ovotestis. Elle est représentée par quelques lacunes isolées qui séparent tantôt le cortex de la médullaire, tantôt s'insèrent entre la médullaire et l'épithélium plat qui ferme l'organe du côté du hile (fig. 7).

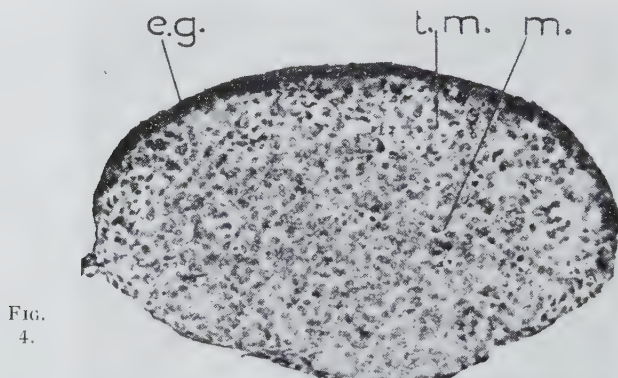


FIG.
4.

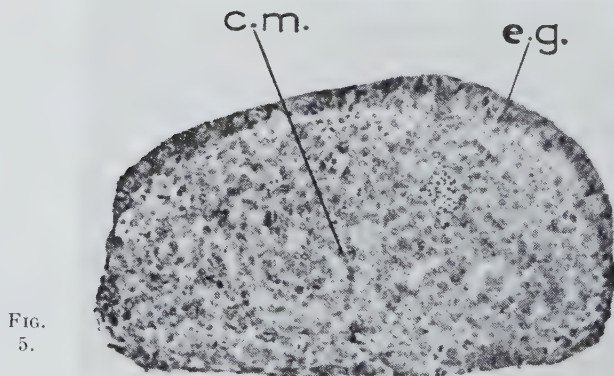


FIG.
5.

FIG. 4. — Coupe transversale d'une gonade gauche d'embryon de Poulet ♂ présumé (stade 7 1/2 jours d'incubation).

e. g., épithélium germinatif.

t. m., zone de tissu mésenchymateux (future albuginée du testicule).

m., médullaire constituée d'un réseau de cordons encore dépourvus d'une lumière. (Gr. : $\times 150$.)

FIG. 5. — Coupe transversale d'une gonade gauche de Poulet ♀ présumée (stade 7 1/2 jours d'incubation).

e. g., épithélium germinatif plus épais que chez le mâle.

c. m., cordons médullaires indifférenciés. (Gr. : $\times 150$.)

Les gonades droites ♀ ont la structure de testicules. Elles ne diffèrent des testicules, prélevés sur des embryons mâles, que par leur forme aplatie et leurs dimensions plus réduites. De nombreux gonocytes sont disséminés à l'intérieur des cordons.

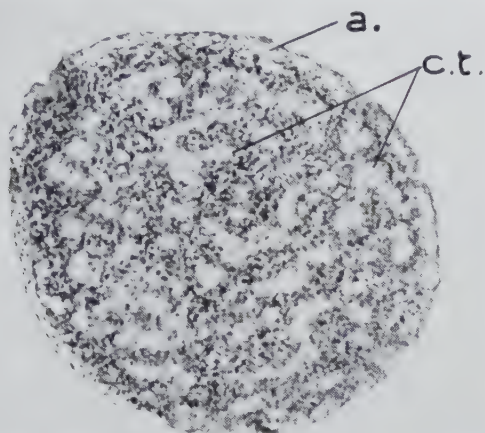


FIG. 6. — Gonade gauche d'embryon de Poulet ♂, prélevée au 9^e jour de l'incubation, après 6 jours de culture en milieu standard naturel : différenciation en testicule caractéristique entouré de son albuginée. Il subsiste quelques communications entre les cordons testiculaires et l'épithélium cœlomique. (D'après ET. WOLFF et K. HAFEN, 1952.)

a., albuginée; c. t., cordons testiculaires. (Gr. : $\times 100$.)

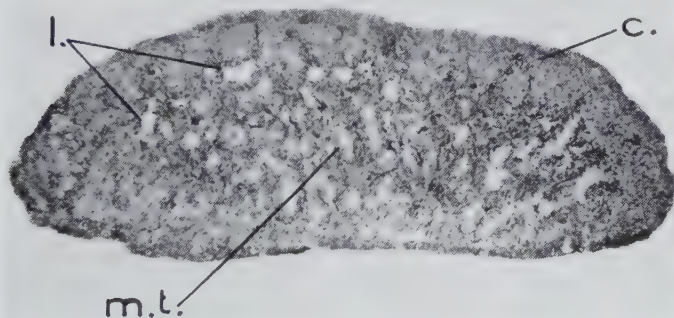


FIG. 7. — Vue générale d'une gonade gauche ♀ d'embryon de Poulet, explantée au 9^e jour de l'incubation, cultivée pendant 5 jours en milieu standard naturel. Structure d'ovotestis.

c., cortex divisé en lobes à ovogonies.

l., zone lacunaire.

m. t., médullaire constituée de cordons testiculaires très différenciés. (D'après ET. WOLFF et K. HAFEN, 1952.) (Gr. : $\times 100$.)

C. — CROISSANCE DES GONADES CULTIVÉES EN MILIEU STANDARD.
ETUDE FAITE CHEZ L'EMBRYON DE POULET

La croissance des gonades, explantées *in vitro*, peut être contrôlée histologiquement par la fréquence des mitoses observées sur les préparations histologiques et, mieux encore, par la croissance pondérale des explants (ET. WOLFF, K. HAFFEN, M. KIENY et EM. WOLFF, 1953). Les gonades, organes très délicats, ne peuvent être soumises à des pesées. Nous nous sommes adressés à une méthode indirecte, le dosage de l'azote total

TABLEAU I

RÉSULTATS DES DOSAGES D'AZOTE TOTAL DE LOTS DE TESTICULES CONTROLATÉRAUX

Stade du prélèvement en jours	Nombre d'organes		Teneur en N total en % par gonade		Variation en %
	Lot A	Lot B	Lot A	Lot B	
9	6	6	4,2	4,4	+ 5
9	6	6	3,5	3,6	+ 3
9	6	6	5,2	4,8	8
9	6	6	5,1	4,6	- 10
9	6	6	4	4,3	+ 7,5
9	6	6	4	3,7	- 7,5
8 1/2	6	6	2,9	3,2	+ 10
8 1/2	6	6	3,2	3,4	6
8 1 2	6	6	4,5	4,1	9
					Erreur maximum : 10 %

des explants, qui offre l'avantage de nous renseigner sur l'assimilation réelle des substances nutritives. Nous utilisons une ultramicrométhode dérivée de la technique de Kjeldahl qui a été décrite et employée par R. VENDRELY (1947).

Les testicules sont le matériel le plus favorable à cette étude. Ils offrent l'avantage d'être des organes paires. L'un des testicules sert de témoin au moment du prélèvement, le partenaire correspondant est cultivé sur le milieu standard pendant une durée de 3 à 4 jours. Chaque dosage est effectué sur 6 à 10 organes.

Etant donné que l'on observe quelquefois une dissymétrie entre les deux testicules d'un même embryon, nous prélevons alternativement un testicule gauche et un testicule droit pour une série de dosages. Les cas de dissymétrie très accentuée n'ont pas été retenus. Deux lots d'organes ainsi constitués sont-ils rigoureusement égaux au départ ?

9 dosages de lots controlatéraux nous ont donné une variation pouvant aller jusqu'à 10 % (tableau I). De ce fait, nous ne pouvons apprécier un gain ou une perte d'N total de gonades cultivées, si la variation positive ou négative n'excède pas 10 %.

Tous les dosages, à l'exception d'un seul (+ 10 %), montrent que les gonades cultivées en milieu standard effectuent une croissance appréciable (tableau II). Il convient cependant de remarquer que cette croissance n'est pas illimitée, elle s'arrête après 4 à 5 jours de culture. Il est probable que des repiquages ou des résections de l'organe s'imposent, de même que ces opérations sont indispensables dans des cultures histiotypiques, pour assurer la prolifération continue des cellules.

TABLEAU II

RÉSULTATS DES DOSAGES D'AZOTE TOTAL
DE TESTICULES D'EMBRYONS DE POULET CULTIVÉS EN MILIEU STANDARD
ET DE LEURS TÉMOINS AU MOMENT DU PRÉLÈVEMENT

Stade du prélèvement en jours	Sexe	Nombre d'organes par lot	Durée de culture en jours	Teneur en N total en γ par gonade		Augmentation de N total en %
				Au moment du prélèvement	Après culture	
9	♀ O ₃ O ₃ O ₃ O ₃ O ₃	10	4	3,7	5,9	+ 60
9		7	3	3,4	5,9	+ 74
9		8	3	4,4	6,3	+ 43
9		7	2 1/2	3,9	6,2	+ 59
9		8	2 1/2	4,8	5,3	+ 10
7 1/2	présumé O ₃ O ₃ O ₃	10	3	3,1	4,6	+ 48
7 1/2	présumé ♂	8	3	2,4	3,9	+ 63

Erreur maximum :
5 %

D. — CONCLUSION

Les gonades indifférenciées de l'embryon de Canard, explantées en culture *in vitro* en milieu standard, se différencient, selon leur sexe génétique, en ovaires et en testicules. Après 5 jours de culture, elles acquièrent une structure bien définie et caractéristique de leur sexe. La gonade droite ♀ subit la même atrophie *in vitro* que dans l'embryon normal.

La différenciation des gonades de l'embryon de Poulet est normale dans le cas du sexe ♂, aberrante dans le cas du sexe ♀; les gonades ne se différencient pas en ovaires, mais en ovotestis. Les gonades droites génétiquement ♀ se différencient en petits testicules.

La croissance des gonades de l'embryon de Poulet de 7 jours 1/2 et de 9 jours a été démontrée par le dosage de l'azote total de testicules, avant et après l'expérience. Elle prouve l'assimilation des substances nutritives par les explants. Cette croissance n'est toutefois pas illimitée, elle s'arrête après 4 à 5 jours d'explantation.

III. — CULTURE DE GONADES EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

La technique de culture *in vitro* en milieu standard s'est révélée favorable au développement des gonades embryonnaires d'Oiseau. Le milieu à base d'extrait d'embryon fournit aux organes les aliments nécessaires à leur développement. Il répond aux trois critères qui nous permettent d'apprécier l'efficacité d'un milieu : la survie, la différenciation et la croissance.

Le but de nos recherches étant l'analyse des facteurs nutritifs de la différenciation et de la croissance des organes embryonnaires, nous nous sommes proposé, en collaboration avec ET. WOLFF, EM. WOLFF et M. KIENY (1953), de remplacer le milieu « naturel » par un milieu « synthétique », en substituant à l'extrait d'embryon des substances de constitution chimique définie, en l'espèce, des acides aminés, des vitamines et des glucides. Ma tâche particulière est de préciser les besoins spécifiques des glandes génitales.

Avant d'entreprendre cette étude, on pouvait se demander quelle est l'évolution des gonades lorsqu'on soustrait du milieu de culture tout aliment ternaire ou quaternaire. SPRATT (1949) a montré que le jeune blastoderme de Poulet dégénère lorsqu'il est explanté dans du liquide de Ringer (dépourvu de glucose).

A. — EXPLANTATION DE GONADES SUR LE SUBSTRATUM DE BASE DÉPOURVU DE GLUCOSE ET D'EXTRAIT D'EMBRYON

Les gonades d'embryons de Poulet et de Canard, prélevées soit avant, soit après le stade de la différenciation sexuelle (7 à 10 jours d'incubation), sont incapables de survivre sur un tel milieu. En l'espace de 24 heures, tous les explants sont nécrosés. On assiste d'abord à une absence d'épithélisation des explants dont les bords s'effritent. Ils prennent un aspect blanc, opaque et se présentent, au bout de 24 heures de culture, comme un amas informe, poussiéreux. L'histologie révèle une nécrose complète des tissus.

B. — EXPLANTATION DE GONADES SUR LE SUBSTRATUM DE BASE ADDITIONNÉ DE GLUCOSE

Nous appelons milieu T, le milieu précédent additionné de glucose. Sa composition est la suivante :

Gélose à 1 % préparée dans du liquide de Gey.....	6 parties.
Solution de Tyrode.....	3 parties.

Ce milieu améliore sensiblement les conditions de l'explantation, mais il n'assure pas une survie prolongée à tous les explants. Les gonades indifférenciées des embryons de Poulet et de Canard se nécrosent au cours des 3 premiers jours de culture. Par contre, les gonades de l'embryon de Poulet, prélevées à un stade où elles sont déjà différenciées en ovaires et en testicules (9 et 10 jours d'incubation), survivent pendant 3 à 4 jours, mais ne font apparemment pas de croissance. Au point de vue histologique, les gonades mâles ont l'aspect de testicules, les gonades ♀ ont la même structure d'ovotestis observée dans le cas du milieu standard.

Les gonades de l'embryon de Canard, prélevées au 11^e jour de l'incubation, survivent également pendant 3 à 4 jours, mais les explants testiculaires ne poursuivent pas leur différenciation amorcée au moment du prélèvement. Chez les gonades ♀, le cortex continue à se développer, alors que la médullaire, peu régressée, a tendance à se nécroser.

En général, on observe peu de mitoses sur les préparations histologiques des explants des deux sexes.

C. — EXPLANTATION DE GONADES EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES COMPOSÉS DE GLUCOSE ET D'ACIDES AMINÉS

1° *Etude du milieu B/2.*

Nous nous proposons maintenant de préparer des milieux nutritifs composés exclusivement de sucres et d'acides aminés. Nous avons d'abord utilisé le mélange d'acides aminés de BERGMANN et NIEMANN (1936), avec lequel FISCHER (1941) et JENSEN (1948) ont tenté la culture de cellules en milieux semi-synthétiques. La composition de la solution synthétique, que nous dénommons B/2, figure au chapitre I. Nous avons pris comme test d'efficacité de ce milieu la survie et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de Canard et de Poulet.

A) LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD CULTIVÉES SUR LE MILIEU B/2. — Les gonades de l'embryon de Canard ont été prélevées à l'âge de 8 jours d'incubation.

La durée de culture a été de 5 à 7 jours. Nous avons montré que cette période était suffisante, dans la plupart des cas, pour assurer la différenciation sexuelle des explants cultivés en milieu standard. Le pourcentage élevé des résultats positifs, le caractère normal des différenciations morphologiques et histologiques nous autorisent à cultiver les gonades droites sur ce milieu dans le but de révéler ou de confirmer le sexe génétique des gonades gauches, cultivées en milieu synthétique.

1° *Evolution morphologique des explants.* — Le milieu B/2 offre aux explants des conditions très favorables à l'explantation. Peu de temps

après leur mise en culture, on assiste à la même évolution divergente et caractéristique des explants mâles et femelles que nous avons observée chez les gonades cultivées en milieu standard. Les explants du type testiculaire ont, après 5 jours de culture, l'aspect de petits boyaux renflés, grossièrement cylindriques, aux contours et aux extrémités arrondis (fig. 8). La masse de l'organe est compacte et d'aspect translucide. Les explants gauches du type ♀ s'aplatissent et s'entourent d'une frange transparente dès les premiers jours de l'explantation. Cette frange s'accroît les jours suivants, en même temps que la masse de l'organe s'aplatit sur son substratum (fig. 9). Très souvent, la gonade entière devient transparente, à l'exception de grosses granulations réfringentes qui occupent le centre de l'organe.



FIG. 8.

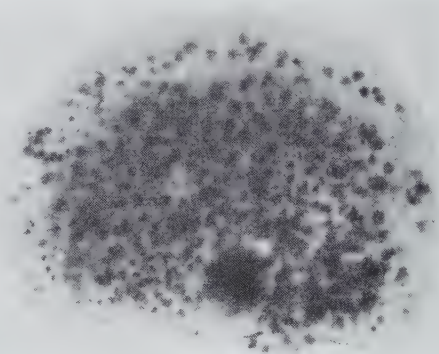


FIG. 9.

FIG. 8. — Gonade d'embryon de Canard prélevée à 8 jours d'incubation et différenciée en testicule sur le milieu B/2 après 5 jours de culture. (Gr. : $\times 35$.)

FIG. 9. — Ovaire d'embryon de Canard, différencié sur le milieu B/2 à partir d'une ébauche indifférenciée, après 5 jours de culture. Noter la frange transparente qui correspond au cortex ovarien. Le centre opaque représente la médullaire. (Gr. : $\times 70$.)

Ce milieu B/2 semble cependant peu favorable à la croissance estimée d'après les dimensions des explants.

Parmi les 48 gonades gauches explantées pendant 5 à 7 jours, 4 se sont nécrosées, 44 ont évolué. Les gonades droites ont confirmé l'origine ♂ de 25 gonades, l'origine ♀ de 23 gonades. Une gonade droite a périclité, de même que la gonade gauche correspondante.

2° *Différenciation histologique des explants.* — 19 gonades sur 23 présentent la structure d'ovaires caractéristiques. Ils sont constitués d'un

cortex épais qui entoure une médullaire généralement mince et vacuolaire (fig. 10). Le cortex contient, dans 10 cas, des ovogonies au repos ou en mitose. Dans 9 cas, il est partiellement ou complètement stérile. 2 gonades sont restées indifférenciées, 2 se sont nécrosées.

La structure histologique des 24 explants, différenciés morphologiquement en testicules et dont le sexe génétique est confirmé par les gonades droites, n'est pas, dans tous les cas, une structure mâle caractéristique. 6 explants seulement ont évolué en testicules typiques (fig. 11). Ils contiennent, sous un épithélium très aplati, des cordons testiculaires

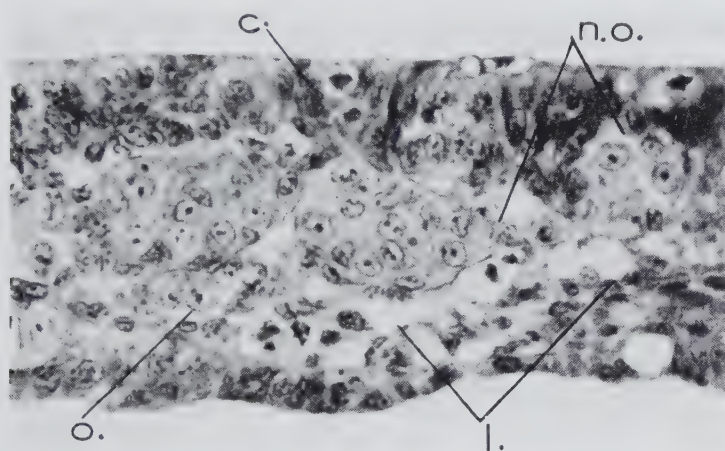


Fig. 10. — Coupe transversale à travers un ovaire de Canard, différencié sur le milieu B/2 après 5 jours de culture. Stade du prélèvement : 8 jours d'incubation. Noter le cortex fertile qui entoure presque complètement une médullaire très vacuolaire.

c., cortex; *l.*, lacunes; *o.*, ovogonies; *n. o.*, nid à ovogonies. (Gr. : $\times 140$.)

bien différenciés, à l'intérieur desquels on trouve des spermatogonies en petit nombre.

5 explants présentent une structure testiculaire peu évoluée. Ils sont constitués de cordons encore étroits, mais dont les cellules pariétales, assez régulièrement organisées, forment un syncytium sertolien. L'épithélium, qui entoure ces gonades, est réduit à une ou deux assises de cellules aplaties dont les noyaux sont orientés tangentiellement (fig. 12).

4 gonades n'ont pas évolué. La médullaire est restée dans un état proche de celui qu'elle présentait au moment de l'explantation. Elle est formée de cordons qui n'ont pas la structure testiculaire. On n'y voit aucune tendance à la formation d'une lumière centrale par vacuolisation des cellules. Les cellules somatiques des cordons demeurent distinctes et

ne forment pas de syncytium. Ces gonades sont également entourées par un épithélium très aplati. Les cellules germinales ont souvent disparu. Certaines, en voie de dégénérescence, ont l'aspect de grosses vacuoles claires occupées par des débris cellulaires. 2 gonades se sont nécrosées.

8 explants, enfin, présentent une structure qui a particulièrement retenu

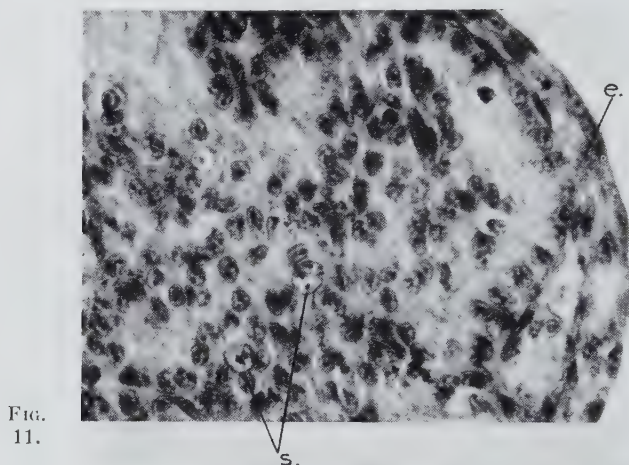


FIG.
11.

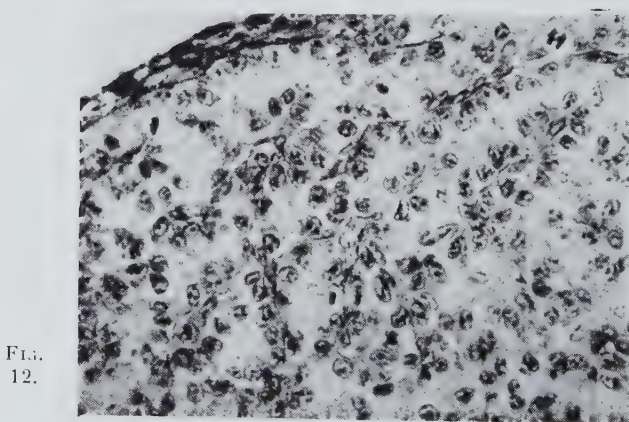


FIG.
12.

FIG. 11. — Détail d'un testicule de Canard, prélevé à 8 jours d'incubation et différencié sur le milieu B/2 après 5 jours de culture. Noter, sous l'épithélium aplati à noyaux orientés tangentiellement, des cordons testiculaires bien différenciés, à l'intérieur desquels on trouve quelques spermatogonies.

e., épithélium aplati; s., spermatogonies. (Gr. : $\times 400$.)

FIG. 12. — Détail d'un testicule d'embryon de Canard, cultivé pendant 5 jours sur le milieu B/2. Structure testiculaire peu évoluée.

Nombreuses cellules en mitose. Stade du prélèvement : 8 jours d'incubation. (Gr. : $\times 480$.)

notre attention. Chez 3 d'entre eux, la médullaire a subi un retard considérable dans son développement. Chez les 5 autres, les cordons médullaires se sont différenciés en cordons testiculaires plus ou moins élargis. Mais, chez tous ces explants, l'épithélium germinatif n'a pas régressé. Il subsiste soit à l'état entier, soit à l'état de lambeaux. Par endroits, il comporte même plusieurs assises de cellules prismatiques dont les noyaux sont orientés perpendiculairement à la surface de la gonade. Des cellules germinales isolées et des cellules en mitose ont été observées

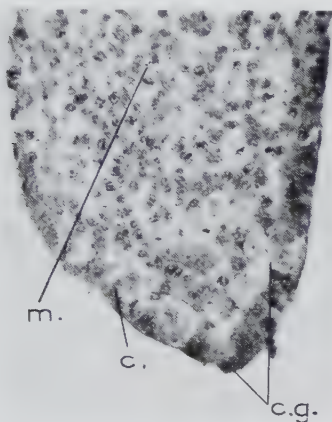


FIG. 13.

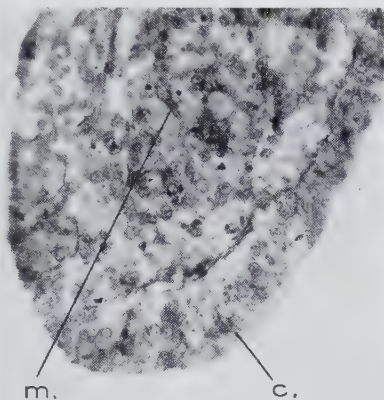


FIG. 14.

FIG. 13. — Gonade de Canard de sexe génétique ♂, cultivée sur le milieu B/2 pendant 5 jours. La médullaire est constituée de cordons peu différenciés; elle est revêtue d'un épithélium germinatif épais qui évoque un cortex. Noter les cellules germinales insérées entre les cellules du cortex. Prélèvement à 8 jours d'incubation.

c. g., cellules germinales; *c.*, cortex; *m.*, médullaire. (Gr. : $\times 280$.)

FIG. 14. — Effet d'une hormone ♀ cristallisée sur la différenciation d'une gonade mâle. Transformation en glande intersexuée : médullaire entourée d'un cortex. Comparer cette figure avec la figure 13. (D'après ET. WOLFF et K. HAFEN, 1952.)

c., cortex; *m.*, médullaire. (Gr. : $\times 355$.)

dans quelques cas (fig. 13). On ne peut pas affirmer que ce cortex ait une structure ovarienne typique, mais la convergence est frappante. Il est curieux de constater qu'une modification du milieu, très certainement une déficience nutritive, provoque des effets analogues à une hormone sexuelle ajoutée à un milieu favorable (fig. 14) et qui sont : l'arrêt de la différenciation médullaire, le maintien et le développement de l'épithélium germinatif (ET. WOLFF et K. HAFEN, 1952 *d*).

En modifiant la constitution de ce milieu synthétique et en éprouvant

d'autres acides aminés, nous pouvons espérer offrir aux explants des conditions de nutrition qui leur permettent de réaliser la différenciation mâle comme nous avons pu les conduire jusqu'à la différenciation femelle.

B) LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES DE L'EMBRYON DE POULET CULTIVÉES SUR LE MILIEU B/2. — Les gonades gauches et droites de l'embryon de Poulet, prélevées à 7 et 8 jours d'incubation, ont été cultivées sur le milieu B/2 pendant une période de 5 à 7 jours (tableau III). Nous n'avons pas explanté les gonades droites sur le milieu standard dans le but de révéler le sexe des gonades gauches, étant donnée la différenciation aberrante des gonades droites ♀ (chapitre II). Nous avons tenté la culture de moitiés de gonades, mais nous avons constaté que, lorsque celles-ci sont prélevées à un stade jeune, elles évoluent mal en milieu synthétique. Elles ont tendance à se nécroser, alors que les moitiés d'ovaires et de testicules, prélevées après le stade de la différenciation sexuelle (10 jours d'incubation), ne diffèrent pas des moitiés correspondantes cultivées sur le milieu standard. Elles évoluent comme des gonades entières. Les ovaires ont l'aspect d'ovotestis caractéristiques : le cortex est bourré d'ovogonies dont un grand nombre subissent les premiers processus de la gamétogenèse et sont à l'état de jeunes ovocytes I, après une période de 8 à 15 jours de culture; la médullaire est testiculaire. Les moitiés de testicules ont également un aspect typique.

1° *Aspect morphologique.* — Les gonades de l'embryon de Poulet survivent dans de bonnes conditions pendant 5 à 7 jours; mais les caractères morphologiques, qui distinguent la différenciation ♂ de la différenciation ♀, ne sont pas très apparents chez les explants de 7 jours. Ils sont plus accentués chez les explants de 8 jours. Les gonades gauches et droites génétiquement ♂ acquièrent peu à peu la forme de petits boyaux renflés, légèrement translucides. Les gonades gauches génétiquement ♀ évoluent en s'aplatissant plus ou moins sur le milieu, mais ne s'entourent pas toujours d'une frange transparente, signe extérieur de la différenciation ovarienne. La région centrale est plus massive que celle d'un ovaire de Canard.

Les gonades droites génétiquement ♀ n'ont pas de caractères extérieurs qui les distinguent nettement des testicules droits. Elles sont légèrement plus aplaties et de dimensions plus réduites, mais ne manifestent aucun signe de régression.

2° *Histologie des explants.* — Certains testicules sont constitués de cordons assez bien individualisés, mais encore peu élargis, ce qui leur confère un aspect moins bien différencié que celui des testicules cultivés sur le milieu standard. Il persiste très souvent, dans le cas des testicules gauches, des lambeaux d'épithélium germinatif plus ou moins épais.

TABLEAU III

DIFFÉRENCIATION MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DES GONADES EMBRYONNAIRES DE POULET, CULTIVÉES SUR LE MILIEU B/2

Milieu	Nombre d'organes explantés sur le milieu B/2		Stade du prélèvement en jours	Durée de culture en jours	Différenciation des gonades gauches		Différenciation des gonades droites	
	Gauches	Droites			Aspect morphologique	Différenciation histologique	Aspect morphologique	Différenciation histologique
B/2	24	24	7	5	9 gonades aplaties, légèrement frangées,	5 ovotestis à cortex peu développé. 4 gonades sans cortex.	9 petits boyaux légèrement aplatis.	2 petits testicules. 6 gonades sans structure définie, plus ou moins saines. 1 gonade nécrosée.
					15 boyaux cylindriques.	4 testicules. 2 testicules peu évolués. 9 gonades indifférenciées.	15 boyaux cylindriques.	3 testicules. 5 testicules peu évolués. 7 gonades indifférenciées.
B/2	7 ♀ pré-sumées. 6 ♂ pré-sumées.	7 ♀ pré-sumées. 6 ♂ pré-sumées.	8	7	7 gonades aplaties, frangées.	2 ovotestis. 4 ovotestis à cortex mince. 1 gonade perdue.	7 petits boyaux aplatis.	4 petites gonades testiculaires. 3 gonades partiellement nécrosées.
					6 boyaux cylindriques ou fuselés.	1 testicule. 4 testicules peu évolués. 1 gonade nécrosée.	6 boyaux cylindriques ou fuselés.	5 testicules peu évolués. 1 gonade nécrosée.

D'autres conservent une structure voisine de celle qu'ils présentaient au stade antérieur à la différenciation. Leur origine ♂ ne pourrait être affirmée avec certitude, étant donné que les gonades droites du type ♂ et ♀ évoluent apparemment en testicules comme sur le milieu standard.

L'histologie des ovaires montre la même différenciation aberrante que celle que l'on observe chez les gonades ♀ cultivées en milieu standard. Ces gonades ont l'aspect d'ovotestis à cortex plus ou moins bien développé, quelquefois stérile. La médullaire, qui occupe la plus grande partie de l'organe, contient des cordons d'aspect presque toujours testiculaire. L'origine ♀ de ces explants n'est pas douteuse. Cependant, certaines gonades, de forme aplatie, mais dépourvues d'une frange transparente, n'ont pas la structure d'ovotestis. Le seul caractère qui les distingue des explants mâles est leur forme oblongue, très étroite. Leur structure est vaguement testiculaire. Elles sont partiellement ou totalement dépourvues de cortex.

Les gonades droites correspondantes survivent moins bien. Certaines d'entre elles sont testiculaires, d'autres présentent une structure indifférenciée ou sont partiellement nécrosées.

2° Etude du milieu C/2.

En utilisant, à la place de l'extrait d'embryon, un mélange défini d'acides aminés (milieu B/2), nous avons obtenu une survie prolongée et une différenciation plus ou moins poussée des gonades embryonnaires. Les résultats, sans être aussi favorables qu'avec l'extrait d'embryon, accusent un net développement des explants et sont bien supérieurs à ceux que l'on obtient avec un simple milieu glucosé. Nous pouvons espérer améliorer la valeur nutritive du milieu actuel par l'addition d'autres acides aminés. Nous avons tenu compte, dans notre choix, des essais d'autres auteurs sur les cultures de tissus en milieux synthétiques (FISCHER et ses collaborateurs, 1941 à 1948; MORGAN, MORTON et PARKER, 1950 à 1955; WHITE, 1946; WAYMOUTH, 1951), des besoins connus des organismes en acides aminés (ROSE, 1938) et des substances, reconnues par EARLE (1952), dans l'ultrafiltrat de sérum et de l'extrait d'embryon.

La composition de la nouvelle solution synthétique, que nous dénommons C/2, figure au chapitre I.

A) LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD CULTIVÉES SUR LE MILIEU C/2. — 1° *Explantation des gonades de 8 jours d'incubation.* — Nous avons cultivé 53 gonades gauches sur ce milieu. Les gonades droites correspondantes, cultivées en milieu standard, ont servi de témoins de la différenciation des gonades gauches. La durée de culture moyenne a été de 5 jours.

Conformément à notre attente, ce milieu s'est montré plus favorable

à la culture des gonades embryonnaires que le milieu B/2. Au point de vue de la différenciation morphologique et histologique, les résultats se rapprochent de ceux que nous avons obtenus sur le milieu à base d'extrait embryonnaire. Les gonades se différencient en ovaires et en testicules reconnaissables à l'aspect extérieur. Elles augmentent de volume, mais n'atteignent cependant pas la taille des gonades cultivées en milieu standard.

Au point de vue histologique, 18 sur 26 gonades génétiquement ♂ se

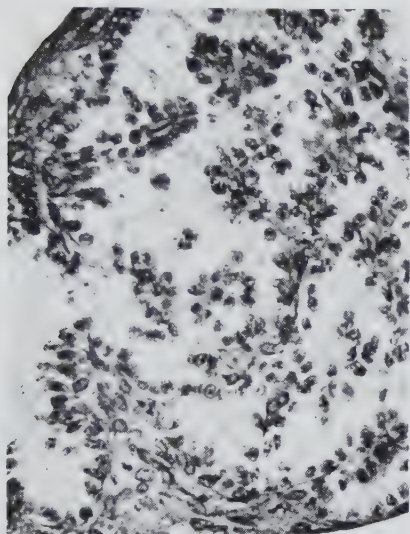


FIG. 15.

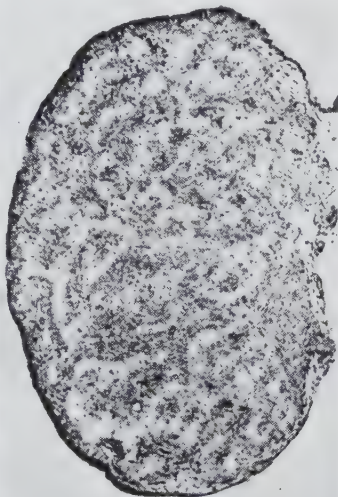


FIG. 16.

FIG. 15. — Structure d'un explant testiculaire de Canard de 8 jours d'incubation, différencié sur le milieu C/2, après 6 jours de culture. Cordons testiculaires à larges lumières, mais stériles. (Gr. : $\times 400$.)

FIG. 16. — Vue générale d'un testicule de Canard âgé de 12 1/2 jours d'incubation, différencié dans l'embryon. Comparer la structure des cordons testiculaires avec celle de la figure 15. (Gr. : $\times 100$.)

sont différenciées en testicules caractéristiques dont certains présentent une structure aussi évoluée que celle d'un testicule d'un embryon de 12 jours (fig. 15 et 16). Les cordons testiculaires, largement dilatés, sont séparés de l'épithélium coelomique par des trainées conjonctives, ébauche de l'albuginée. Dans 3 cas, nous avons observé la persistance de l'épithélium germinatif, plus ou moins développé par endroits et un retard dans la différenciation de la médullaire. 3 gonades ne se sont pas différenciées, 2 gonades se sont nécrosées.

Les gonades génétiquement ♀ se sont différenciées en ovaires caractéristiques plus ou moins fertiles, dans 24 cas sur 27 (fig. 17). Deux ovaires seulement ont présenté un cortex peu élevé, recouvrant un tissu médullaire lâche et vacuolaire; 1 gonade s'est nécrosée.

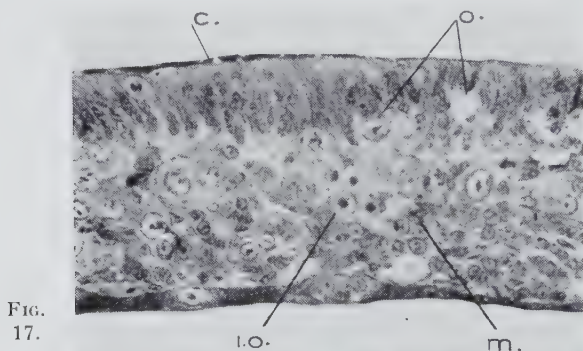


FIG.
17.

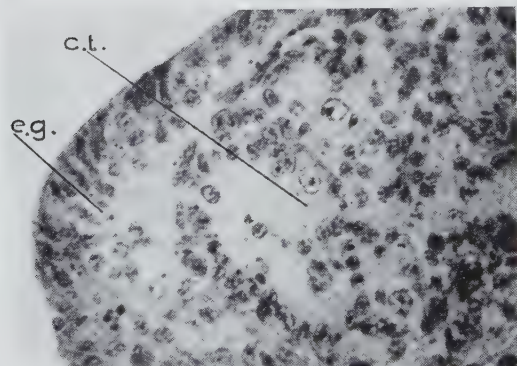


FIG.
18.

FIG. 17. — Coupe transversale à travers un ovaire de Canard, prélevé à 8 jours d'incubation, différencié sur le milieu C/2, après 5 jours de culture. Le cortex contient dans sa profondeur des ovogonies au repos et en mitose ayant donné naissance à des îlots.

c., cortex; o., ovogonies; i. o., îlot à ovogonies; m., médullaire. (Gr. : $\times 345$.)

FIG. 18. — Gonade ♂ d'embryon de Canard de 7 jours d'incubation, après 5 jours de culture sur le milieu C/2. L'épithélium germinatif, qui comporte plusieurs assises de cellules prismatiques, recouvre la médullaire constituée de cordons testiculaires très évolués.

e. g., épithélium germinatif; c. t., cordons testiculaires. (Gr. : $\times 415$.)

2° *Explantation des gonades de 7 jours d'incubation.* — La culture des gonades gauches, prélevées à l'état de très jeunes ébauches, est aisément réalisable sur ce milieu. Si les gonades génétiquement ♀ se différencient en ovaires caractéristiques (10 cas), il n'en est pas de même des gonades

TABLEAU IV

DIFFÉRENCIATION MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DES GONADES EMBRYONNAIRES DE POULET, CULTIVÉES SUR LE MILIEU C/2

Milieu	Nombre d'organes explantés sur le milieu C/2		Stade du prélevement en jours	Durée de culture en jours	Différenciation des gonades gauches		Différenciation des gonades droites	
	Gauches	Droites			Aspect morphologique	Différenciation histologique	Aspect morphologique	Différenciation histologique
C/2	14	14	7	6	8 gonades aplaties, frangées.	6 ovotestis, 2 ovotestis à cortex mince.	8 petits boyaux aplatis.	4 gonades testiculaires. 4 gonades indifférenciées.
					6 boyaux translucides, fuselés.	5 testicules avec épithélium germinatif. 1 testicule peu évolué.	6 boyaux cylindriques ou fuselés.	4 testicules. 2 testicules peu évolués.
C/2	13 ♀ pré-sumés. 12 ♂ pré-sumés.	13 ♀ pré-sumés. 12 ♂ pré-sumés.	8	7	13 gonades aplaties, frangées.	4 ovotestis. 5 ovotestis à cortex mince. 4 gonades non examinées.	13 petits boyaux aplatis.	7 petites gonades plus ou moins testiculaires. 2 gonades indifférenciées. 4 gonades non examinées.
					12 boyaux translucides, fuselés.	8 testicules. 2 testicules peu évolués. 2 gonades indifférenciées.	12 boyaux cylindriques ou fuselés.	6 testicules. 4 testicules peu différenciés. 2 gonades indifférenciées.

du sexe ♂. La médullaire évolue normalement. Elle acquiert la structure ♂ caractéristique : les cordons testiculaires sont très évolués dans 10 cas sur 12, mais l'épithélium germinatif n'a pas complètement régressé. Il subsiste sous forme de lambeaux plus ou moins étendus qui comportent fréquemment plusieurs assises de cellules prismatiques (fig. 18). Nous n'avons jamais observé de telles structures chez des gonades ♂ du même âge cultivées en milieu standard. Il est troublant de constater qu'un testicule, ayant une structure médullaire aussi évoluée que celle d'un

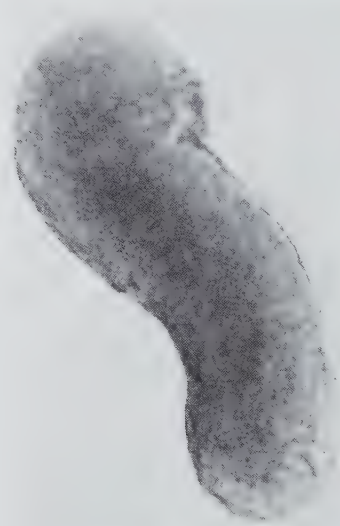


FIG. 19.

Gonade gauche d'un embryon de Poulet de 8 jours, après 5 jours de culture sur le milieu C/2. Aspect testiculaire caractéristique. (Gr. : $\times 35$.)

testicule du même âge différencié dans l'embryon, conserve partiellement un épithélium germinatif presque aussi épais qu'une gonade indifférenciée de 7 jours.

B) LE DÉVELOPPEMENT DES GONADES DE L'EMBRYON DE POULET CULTIVÉES SUR LE MILIEU C/2. — Le milieu C/2 s'est également révélé plus favorable à la culture des gonades embryonnaires de Poulet que le milieu B/2. Les gonades prélevées avant le stade de la différenciation sexuelle, à l'âge de 7 et 8 jours, se différencient en ovaires et en testicules, reconnaissables à l'aspect extérieur (tableau IV).

1° *Différenciation testiculaire.* — Après 5 jours d'explantation, on reconnaît aisément les testicules à leur forme. Ce sont des boyaux renflés, cylindriques, quelquefois fuselés. Ils sont beaucoup plus translucides que sur le milieu B/2 (fig. 19). Histologiquement, ils acquièrent presque tous la structure mâle caractéristique. Ils sont entourés d'une enveloppe conjonctive. A l'intérieur, les cordons testiculaires s'élargissent. Les

cellules germinales sont plus ou moins nombreuses et inégalement réparties (fig. 20). A la surface de certains testicules gauches, il subsiste encore des fragments d'épithélium germinatif. Les cordons sont en

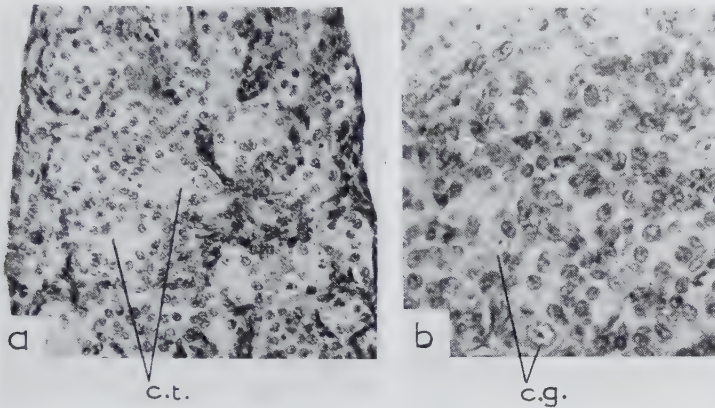


FIG. 20. — *a.* Coupe à travers un testicule d'embryon de Poulet, prélevé à 8 jours, cultivé pendant 5 jours sur le milieu C/2. Cordons d'aspect testiculaire typique. (Gr. : $\times 280$.)

b. Détail montrant les cellules germinales inégalement réparties à l'intérieur de certains cordons.

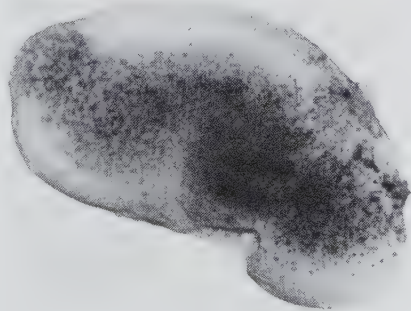
c. g., cellules germinales; *c. t.*, cordons testiculaires. (Gr. : $\times 440$.)

rapport avec ces lambeaux ou s'ouvrent directement à l'extérieur. On rencontre de très nombreuses mitoses parmi les cellules de Sertoli, les gonocytes et le tissu intertubulaire.

=====

FIG. 21.

Ovaire d'embryon de Poulet, prélevé à 7 1/2 jours d'incubation, cultivé pendant 7 jours sur le milieu C/2. Noter la frange transparente. La région centrale est plus massive que chez un ovaire de Canard. (Gr. : $\times 35$.) Comparer cette figure avec la figure 9.



=====

2° *Différenciation ovarienne.* — Les gonades gauches ♀ prennent l'aspect d'ovaires reconnaissables macroscopiquement (fig. 21). Au point de vue histologique, ces ovaires ont l'aspect typique des ovotestis obtenus

sur le milieu standard. Le cortex, par endroits très épais, contient de nombreuses ovogonies au repos (fig. 22). Dans certains cas, il est stérile, comme nous l'avons observé en milieu standard. La médullaire constitue un important massif de cordons d'aspect toujours testiculaire, souvent très bien différenciés. Les mitoses sont également très abondantes dans les tissus somatiques des deux zones. On en trouve aussi dans les ovogonies.

Les gonades droites ♀ ne sont pas reconnaissables, en tant que ♀, à leur aspect extérieur. Elles ont la forme de petits testicules aplatis. Elles ne régressent pas. Histologiquement, leur structure est le plus souvent testiculaire; dans quelques cas, les cordons restent indifférenciés sans présenter de lacunes.

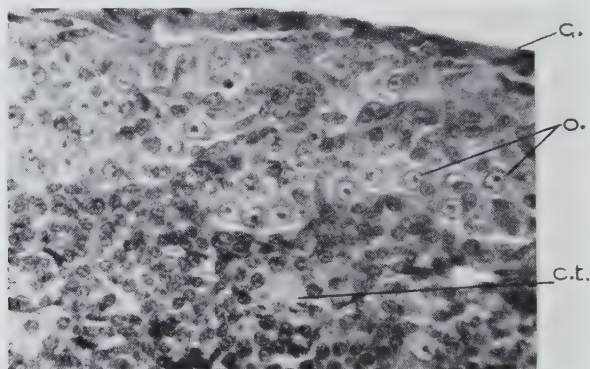


FIG. 22. — Détail d'une gonade ♀ d'embryon de Poulet, prélevée à 8 jours d'incubation, cultivée pendant 6 jours sur le milieu C/2. Structure d'ovotestis. Noter le cortex ovarien contenant de nombreuses ovogonies et la médullaire formée de cordons testiculaires également fertiles.

c., cortex; c. t., cordons testiculaires; o., ovogonies. (Gr. : $\times 465$.)

D. — PROBLÈME DE LA CROISSANCE DES GONADES EMBRYONNAIRES EN CULTURE « IN VITRO » EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Ainsi que nous l'avons indiqué au chapitre II, nous avons eu recours à une technique biochimique, celle du microdosage de l'azote total. Nous avons montré que l'on ne peut apprécier un gain ou une perte d'azote de gonades cultivées *in vitro* si la variation positive ou négative n'excède pas 10 %; l'écart initial entre deux lots d'organes controlatéraux peut être de cet ordre de grandeur.

Les dosages sont effectués sur des testicules d'embryons de Poulet cultivés sur les milieux B/2 et C/2.

Les gonades, lorsqu'elles sont prélevées après la différenciation sexuelle, au 10^e jour de l'incubation et cultivées sur le milieu B/2, ont montré, dans un cas, un accroissement de l'azote total; dans tous les

TABLEAU V

RÉSULTATS DES DOSAGES DE L'AZOTE TOTAL
DES GONADES CULTIVÉES EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES ET DE LEURS TÉMOINS
AU MOMENT DU PRÉLÈVEMENT

Milieu étudié	Stade du prélèvement en jours	Sexe	Nombre d'organes par lot	Durée de culture en jours	Teneur en N total en γ par gonade		Variation de N total en %
					Au moment du prélèvement	Après culture	
B/2	9	σ	8	3	3,2	3,6	+ 13
B/2	9	σ	10	3	5,8	4,5	- 29
B/2	9	σ	6	3	4,8	4,4	- 8
B/2	7 1/2	σ	7	3	3,1	2,8	- 11
B/2	7 1/2	préssumé. σ préssumé.	8	3	3,4	3	- 12
C/2	9	σ	10	3	3,4	3,8	+ 12
C/2	9	σ	10	3	5,9	6,9	+ 17
C/2	9	σ	6	2	4,4	4,3	- 2
C/2	9	σ	6	2	3,7	4,2	+ 14
C/2	9 1/2	σ	6	2	5	6,3	+ 26
C/2	9 1/2	σ	8	2	5,1	5,3	+ 4
C/2	9 1/2	σ	8	2	5,3	6,7	+ 3
C/2	9 1/2	σ	6	2	5,7	4,7	- 18
C/2	9 1/2	σ	6	2	6,6	7,7	+ 17
C/2	9 1/2	σ	6	2	4,6	4,5	- 2
C/2	9 1/2	σ	6	2	4,7	4	- 15
C/2	9 1/2	σ	6	2	4,8	4,5	- 7
C/2	9 1/2	σ	6	2	4,7	4,1	- 1
C/2	9 1/2	σ	6	2	3,7	3,8	+ 3
C/2	9 1/2	σ	6	2	3,7	4,6	+ 24
C/2	9 1/2	σ	6	2	4,9	6,2	+ 27
C/2	9 1/2	σ	6	2	5,1	5,5	+ 8
C/2	9 1/2	σ	6	2	4,3	4,3	0
C/2	10	σ	6	2	6,3	6,6	+ 5
C/2	7 1/2	σ préssumé.	8	3	4,1	4,3	+ 5
C/2	7 1/2	σ préssumé.	6	3	3,4	3,3	- 3
C/2	7 1/2	σ préssumé.	8	2	4,3	2,6	- 40
C/2	7 1/2	σ préssumé.	8	2	3,1	2,8	- 10
C/2	7 1/2	σ préssumé.	10	2	2,9	2,6	- 10
Erreur maximum :							5 %

autres cas, prélevées à 7 jours 1/2, elles accusent une perte de 4 à 29 % (tableau V).

Sur le milieu C/2, la variation de l'azote total pour les gonades de 9 à 9 jours 1/2 est de - 18 à + 27 %. En moyenne, elle représente un accroissement de 6 %. Pour les gonades de 7 jours 1/2, la teneur en azote reste stationnaire ou diminue. Cette perte s'élève, en moyenne, à 9 %.

Si l'on admet une erreur maximum de 5 % sur les résultats des dosages, on voit que la croissance est très faible sur le milieu C/2. Elle est nettement inférieure à celle que les gonades effectuent en milieu naturel.

E. — CONCLUSION

Les milieux synthétiques B/2 et C/2, qui contiennent respectivement 9 et 21 acides aminés, se sont révélés très favorables à la survie de 5 à 7 jours des gonades embryonnaires. La morphogenèse externe et la structure histologique des gonades de l'embryon de Poulet, cultivées sur le

Différenciation histologique des gonades de l'embryon de Canard cultivées sur les milieux : B/2, C/2 et Standard.

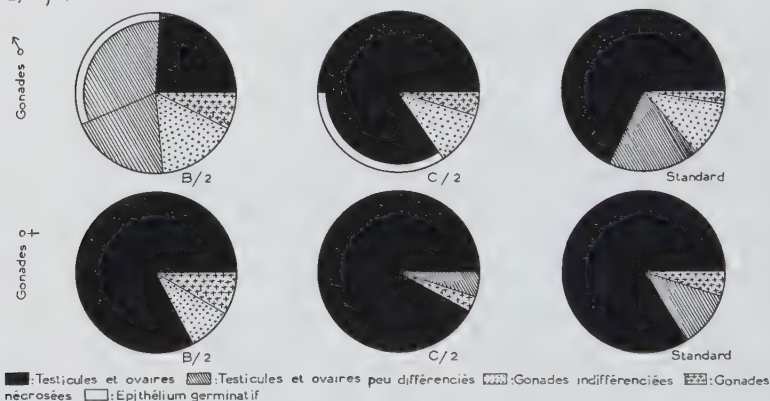


FIG. 23. — Les diagrammes sont basés sur l'étude histologique de :

25 testicules et 23 ovaires cultivés sur le milieu B/2;

38 testicules et 37 ovaires cultivés sur le milieu C/2;

220 testicules et 46 ovaires cultivés sur le milieu standard.

milieu C/2, sont très voisines de celles que l'on observe en milieu standard. Il en est de même des gonades de 8 jours de l'embryon de Canard; les gonades ♂ de 7 jours se différencient en testicules, mais conservent un épithélium germinatif partiel.

Sur le milieu B/2, la culture des gonades, en particulier celle des gonades ♂ de l'embryon de Canard, s'est révélée plus délicate. Ce milieu ne répond pas d'une manière satisfaisante aux exigences nutritives des gonades du sexe ♂. La différenciation sexuelle de cette catégorie d'organes se réalise à des degrés divers qui vont de l'absence de différenciation à l'acquisition des caractères typiques, en passant par une forme intermédiaire qui prend celle d'une intersexualité apparente.

Les gonades, lorsqu'elles sont prélevées après la différenciation sexuelle et cultivées sur le milieu C/2, effectuent une croissance nettement moins importante qu'en milieu standard, mais qui accuse néanmoins l'assimi-

lation des acides aminés du milieu. Ces résultats corroborent ceux que nous avons observés au point de vue morphologique.

Nous nous proposons de représenter schématiquement les différentes éventualités du développement des gonades de l'embryon de Canard cultivées sur les milieux B/2 et C/2 (fig. 23). Les résultats sont comparés à ceux que l'on obtient en milieu standard. Le diagramme, qui correspond au développement des gonades ♂ en milieu standard, est basé sur l'étude histologique de 220 testicules dont 191 sont des testicules droits, témoins des séries expérimentales en milieux synthétiques.

Le développement normal (ovaires ou testicules) est représenté en noir. Quel que soit le milieu, la différenciation des gonades femelles (en bas) se réalise plus aisément que la différenciation des gonades mâles. Elle s'effectue aussi bien sur le milieu synthétique C/2 que sur le milieu standard. Quelques explants ne se différencient pas ou se différencient mal. Les unes et les autres de ces formations montrent que la différenciation sexuelle d'une ébauche de gonade ♀ n'est pas liée automatiquement à une survie, même prolongée, de l'organe.

La partie supérieure du tableau illustre le développement des gonades ♂. La couleur noire est dominante dans le cas des milieux standard et C/2. Elle montre que la différenciation des cordons médullaires en cordons testiculaires s'effectue chez la majorité des explants cultivés sur les deux milieux. Dans le cas du milieu B/2, elle montre que ce milieu est peu favorable à la différenciation des gonades ♂.

L'épithélium germinatif (représenté par la bande blanche), qui persiste chez de nombreux explants, cultivés sur les milieux B/2 et C/2, n'a jamais été observé chez les explants cultivés sur le milieu standard, sans qu'on l'ait volontairement induit (ET. WOLFF et K. HAFFEN, 1952). Sa présence est anormale à ce stade du développement. Elle l'est d'autant plus chez les explants cultivés sur le milieu C/2 où la différenciation de la médullaire est très évoluée. Ces ambiguïtés de structure sont vraisemblablement dues à la composition même des milieux synthétiques qui entraînent un déséquilibre hormonal des explants.

IV. — ÉTUDE DES BESOINS EN ACIDES AMINÉS DES GONADES EMBRYONNAIRES D'OISEAU

A. — ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

Tous les constituants qui entrent dans la composition des milieux synthétiques complexes B/2 et C/2 sont-ils indispensables au développement des gonades ? Des milieux plus simples, qui renferment un nombre restreint d'acides aminés, sont-ils encore capables d'assurer aux explants la survie et de favoriser leur différenciation ?

Nous nous sommes proposé d'entreprendre l'analyse des composés qui sont indispensables, essentiels ou simplement favorables (1) aux gonades embryonnaires d'Oiseau et de préciser leurs besoins spécifiques.

Nous avons abordé le problème, d'une part, en soustrayant un ou plusieurs acides aminés aux milieux précédemment éprouvés et, d'autre part, en étudiant l'efficacité de chacun des acides aminés isolés (K. HOFFEN et EM. WOLFF, 1953). Dans les premiers essais, ces milieux ont été éprouvés sur les gonades d'embryons de Poulet. Nous avons pris, comme test d'efficacité des milieux, la survie et la différenciation morphologique des gonades, prélevées au 9^e jour de l'incubation.

Cette étude a été très longue, étant donné les nombreuses combinaisons d'acides aminés réalisables et la nécessité de modifier la concentration d'un certain nombre d'entre eux.

Aucun des acides aminés éprouvés isolément ne s'est montré favorable à une survie de 48 heures, à l'exception de la cystéine et de la méthionine. Tous les milieux dans la composition desquels entre la cystéine sont favorables. Parmi les milieux réduits à quelques acides aminés, le plus simple, qui a particulièrement retenu notre attention, était constitué de 3 acides aminés : la cystéine, la méthionine et l'arginine (milieu 26).

Les autres acides aminés, bien que s'étant révélés moins efficaces à première vue, feront l'objet d'une étude plus approfondie.

B. — ELABORATION D'UN MILIEU MINIMUM
FAVORABLE AU DÉVELOPPEMENT
DES GONADES EMBRYONNAIRES D'OISEAU

Cette étude a été entreprise chez l'embryon de Canard.

Dans toutes les expériences, les gonades gauches, prélevées vers la fin du 8^e jour de l'incubation, sont cultivées en milieu synthétique; les gonades droites correspondantes évoluent en milieu standard. La valeur de chaque milieu éprouvé est comparée à celle du milieu B/2 ou C/2 selon deux tests qui sont : la survie de 5 jours des gonades gauches et leurs différenciations morphologique et histologique.

(1) Nous qualifions un acide aminé :

— *d'indispensable* lorsque son absence dans un milieu synthétique provoque la nécrose des organes;

— *d'essentiel* lorsqu'il agit efficacement sur la différenciation sexuelle des gonades; son élimination d'un milieu synthétique n'entraîne pas la nécrose des explants;

— *de favorable* s'il améliore le caractère d'un critère (survie ou différenciation).

1° *Développement des gonades embryonnaires de Canard
cultivées sur le milieu 26.*

La solution synthétique, incorporée à la gélose selon la technique habituelle décrite au chapitre I, est la suivante :

Cystéine	6 mg
Méthionine	5,2 mg
Arginine	15,4 mg

pour 100 cm³ de Tyrode.

Le milieu composé de 3 acides aminés est très favorable à la survie et au développement des gonades femelles. A ces deux points de vue, il apparaît aussi efficace que le milieu B/2. Les gonades femelles, indifférenciées au moment du prélèvement, évoluent en ovaires reconnaissables macroscopiquement à leur aplatissement sur le milieu et à la frange transparente qui les entoure. Au point de vue histologique, ils sont constitués d'un cortex épais, pluristratifié et d'une médullaire étroite et lacunaire, dans laquelle pénètrent des cordons corticaux. Dans le cas d'explants fertiles (4 cas), le cortex et les cordons renferment des ovogonies isolées ou groupées en ilots. Une gonade seulement a présenté une structure peu différenciée, caractérisée par la présence d'un cortex insuffisamment développé et d'une importante zone médullaire qui contient de nombreux cordons denses et quelques cordons lâches et vacuolaires. Elle n'est pas envahie par des proliférations corticales. Les cellules germinales sont rares. La nature ovarienne de cette gonade n'est pas douteuse, étant donné que la gonade droite correspondante, cultivée en milieu standard, a subi la régression caractéristique des gonades droites femelles.

Ce milieu n'assure cependant pas un aussi bon développement aux organes du sexe mâle. Seul un petit nombre de gonades évoluent en testicules dont l'aspect histologique correspond à l'aspect morphologique. La majorité des explants ne survit pas et se nécrose avant la fin de la culture; il n'en est pas ainsi sur le milieu B/2 qui, sans favoriser beaucoup la différenciation, assure néanmoins une survie d'au moins 5 jours de la presque totalité des gonades génétiquement mâles (tableau VI).

2° *Essais d'amélioration du milieu 26
par addition d'autres acides aminés.*

Nous avons d'abord éprouvé l'efficacité de 6 acides aminés, qui entrent dans la composition du milieu B/2, ajoutés un à un au milieu de base 26. Nous avons ensuite recomposé des mélanges simples à partir des plus efficaces d'entre eux. Les concentrations, qui ont été essayées, sont celles du milieu B/2 (voir tableau VII). Le milieu 26 n'est pas amélioré par l'un ou l'autre des acides aminés ajouté isolément. La proline, l'acide aspar-

TABLEAU VI. - DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES EMBRYONNAIRES DE CANARD PRÉLEVÉES VERS LA FIN DU 8^e JOUR DE L'INCUBATION ET CULTIVÉES SUR LE MILIEU 26

Milieu synthétique	Nombre total d'explants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles après 5 jours de culture				Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles après 5 jours de culture			
			Testicules	Testicules peu évolués	Testicules avec c. g.	Structures indifférenciées	Nécroses	Ovaires	Ovaires peu différenciés	Structures indifférenciées	Nécroses
26	22	13	3	—	2	—	8	6	1	—	2
13/2 (témoin).	23	13	4	—	2	7	—	7	—	1	2

é. g. : épithélium germinatif.

tique et le tryptophane ont un effet nuisible à la survie des gonades. Par contre, certaines combinaisons de 2 ou 3 acides aminés, telles que : lysine-histidine, histidine-acide glutamique ou histidine-acide glutamique-lysine, associées aux 3 acides aminés, cystéine, méthionine et arginine, assurent la survie des gonades d'une manière aussi efficace que les milieux B/2 et C/2.

Au point de vue de la différenciation, les milieux sont en général plus favorables aux gonades femelles qu'aux gonades mâles. L'investigation histologique montre que 3 éventualités de développement peuvent se produire :

1° Les organes effectuent leur différenciation en testicules et en ovaires (fig. 17 et 24).

2° Les organes évoluent, mais n'acquièrent pas de structure tout à fait caractéristique. Ce sont les testicules et les ovaires peu différenciés et les gonades mâles qui ont conservé un épithélium germinatif (fig. 12 et 13).

3° Le développement n'a pas lieu. Ce sont les gonades indifférenciées (fig. 28).

Les structures histologiques des différentes catégories d'explants ont déjà été décrites au cours des chapitres précédents. Elles apparaissent sur tous les milieux, mais en proportions variables. Les milieux les plus favorables sont évidemment

TABLEAU VII. — INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS DU MILIEU B/2 SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD PRÉLEVÉES À LA FIN DU 8^e JOUR DE L'INCUBATION

N ^o du milieu synthé- tique	Acides aminés ajoutés au milieu de base 26	Concen- tration des acides aminés en mg pour 100 cm. ³ de Tyrode	Nombre total d'explants	Nombre de gonades droites males	Différenciation des gonades gauches males après 5 jours de culture						Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles après 5 jours de culture				
					Testicules avec c. g.	Testicules avec c. g.	Testicules peu évolués avec c. g.	Struc- tures indifé- renciées	Nécroses	Ovaires		Ovaires légè- rement diffé- renciés	Struc- tures indifé- renciées	Nécroses		
26	—	—	29	17	4	1	1	—	3	8	—	12	10	1	—	1
	Proline.	10,2	8	6	—	—	—	—	—	6	—	2	—	—	—	2
	Acide aspartique.	11,8	8	5	—	—	—	—	—	5	—	3	—	1	—	2
	Tryptophane.	10	10	5	5	—	1	—	—	4	—	5	1	2	—	2
	Lysine.	30,2	19	9	9	2	1	1	2	3	—	10	6	2	—	2
	Acide glutamique.	28,2	23	12	12	3	—	1	2	6	—	11	4	2	2	3
46	Histidine.	6,2	26	12	2	2	1	—	3	4	—	10	7	2	1	—
	Lysine.	30,2	17	9	9	2	1	1	2	3	—	8	4	3	—	1
	Acide glutamique.	28,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	23	20	—	1	2
	Lysine.	30,2	45	22	22	7	5	4	—	1	—	—	17	3	—	—
	Histidine.	6,2	—	—	—	—	—	—	—	3	—	20	17	—	—	—
	Acide glutamique.	28,2	40	20	20	8	4	—	5	—	—	8	7	1	—	—
50	Lysine.	30,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Histidine.	6,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Acide glutamique.	28,2	31	23	4	1	5	—	10	3	—	8	7	1	—	—
	Lysine.	30,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B/2 C/2	Histidine.	6,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Acide glutamique.	28,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Témoins.	—	23	13	3	1	3	2	3	1	—	10	8	—	1	1
	—	—	26	14	9	1	2	—	1	1	—	12	11	1	—	—

ceux qui permettent au plus grand nombre d'explants de réaliser leur différenciation normale, conformément à leur sexe génétique.

Pour faciliter la comparaison des résultats obtenus sur les différents milieux, nous nous proposons de les représenter sous forme de diagrammes (fig. 25).



FIG. 24. — Aspect général de testicules prélevés à la fin du 8^e jour de l'incubation, différenciés sur le milieu 50, après 5 jours (*a*) et 13 jours de culture (*b*).

Ampoules testiculaires à larges lumières séparées de l'épithélium coelomique par une albuginée conjonctive.

a. c., albuginée conjonctive; *am. t.*, ampoules testiculaires. (Gr. : $\times 160$.)

Ces diagrammes montrent que :

1° Ni la lysine, ni l'histidine, ni l'acide glutamique, ajoutés isolément au milieu 26, ne favorisent la différenciation des explants testiculaires.

2° La présence simultanée de ces trois acides aminés, bien que favorable à la différenciation des gonades femelles, semble inhiber la différenciation des testicules.

3° Certains acides aminés n'agissent qu'en synergie avec d'autres. Ainsi, la lysine semble exiger la présence d'histidine (milieu 46), l'histidine celle de l'acide glutamique (milieu 50). Certaines associations d'acides aminés se révèlent peu favorables, telle l'association lysine-acide glutamique.

Il est intéressant de constater que des résultats analogues ont été obtenus par M. KIENY (1955 *a*) sur la culture de tibias d'embryons de Poulet. Dans ce cas, l'acide glutamique est un composé essentiel dont

Différenciation histologique des gonades de l'embryon de Canard cultivées sur différents milieux synthétiques.

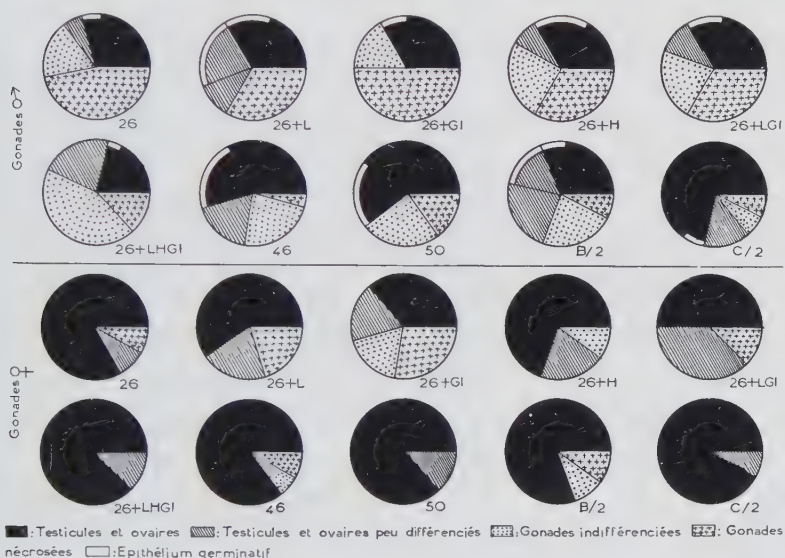


FIG. 25. — L., lysine; H., histidine; GI., acide glutamique.

l'action se trouve renforcée par la présence de l'un ou de l'autre des deux composés suivants : lysine ou histidine. La présence simultanée de lysine et d'histidine s'est révélée inefficace.

En définitive, c'est le milieu composé de cystéine, de méthionine, d'arginine, d'histidine et d'acide glutamique (milieu 50) qui a donné les meilleurs résultats tant au point de vue de la survie qu'au point de vue de la différenciation des explants des deux sexes. Il est plus favorable que le milieu B/2, mais il n'atteint pas la valeur du milieu C/2.

Le milieu 46, composé de cystéine, de méthionine, d'arginine, de lysine et d'histidine, est également favorable au développement des gonades. Il s'est montré très propice à la culture de syrx d'embryons de Poulet (EM. WOLFF, 1955).

3° Etude du pH.

Les mesures de pH sont effectuées à la surface de chaque milieu de culture, à l'aide d'une électrode de contact. Des gonades âgées de 8 jours d'incubation sont cultivées par paire sur un même milieu. Des milieux de culture dépourvus d'organes servent de témoins. On détermine le pH initial des milieux 6 heures après la mise en incubation des salières de culture. Ce pH initial, mesuré à la température de 38°, se situe entre 7,3 et 7,5 pour les 3 milieux synthétiques étudiés (50, 46 et C/2), entre 7,6 et 7,8 pour le milieu standard naturel.

Les courbes représentatives de l'évolution du pH en fonction de la durée de culture (fig. 26) montrent :

1° que le pH de tous les milieux synthétiques, avec ou sans organes, est plus alcalin après un jour de culture, qu'au départ;

2° que les milieux témoins manifestent une légère tendance à l'augmentation du pH jusqu'à la fin de la culture;

3° que le pH des milieux contenant des organes tend à diminuer à partir du 2° ou du 3° jour de culture.

4° *Le rôle des acides aminés sulphydrilés dans le développement des gonades de l'embryon de Canard cultivées en milieux synthétiques.*

Les besoins des organismes en acides aminés sulphydrilés ont été reconnus par un certain nombre d'auteurs. ROSE (1938) a attiré l'attention sur l'intérêt particulier que représente la relation cystéine-méthionine dans la nutrition du jeune Rat. La cystéine, ajoutée à un régime dépourvu d'acides aminés soufrés, n'arrête pas la chute de poids, alors que la croissance reprend rapidement après addition de méthionine. La cystéine, cependant, stimule la croissance à condition que la méthionine soit présente dans le régime. Il en conclut que l'organisme est capable de synthétiser la cystéine à partir de la méthionine. GRAU et ALMQUIST (1943) confirment la validité de ces observations chez le Poulet. GENGHOF (1951) montre, chez *Tetrahymena geleii*, que la méthionine, non la cystine, est nécessaire à la croissance.

Les recherches de A. FISCHER (1941-1948) ont montré que la prolifération des cellules, en culture de tissus, est liée à la présence de groupements sulphydrilés dans le milieu. Les cellules embryonnaires de Poulet, cultivées sur un milieu à base de plasma ou de jus d'embryon dialysés, dégénèrent rapidement. L'addition, au milieu, des acides aminés du mélange de BERGMANN et NIEMANN empêche la désintégration et la mort des cellules. L'acide aminé le plus important est la cystine. Sans cystine, tous les autres acides aminés sont incapables de compenser le milieu déficient.

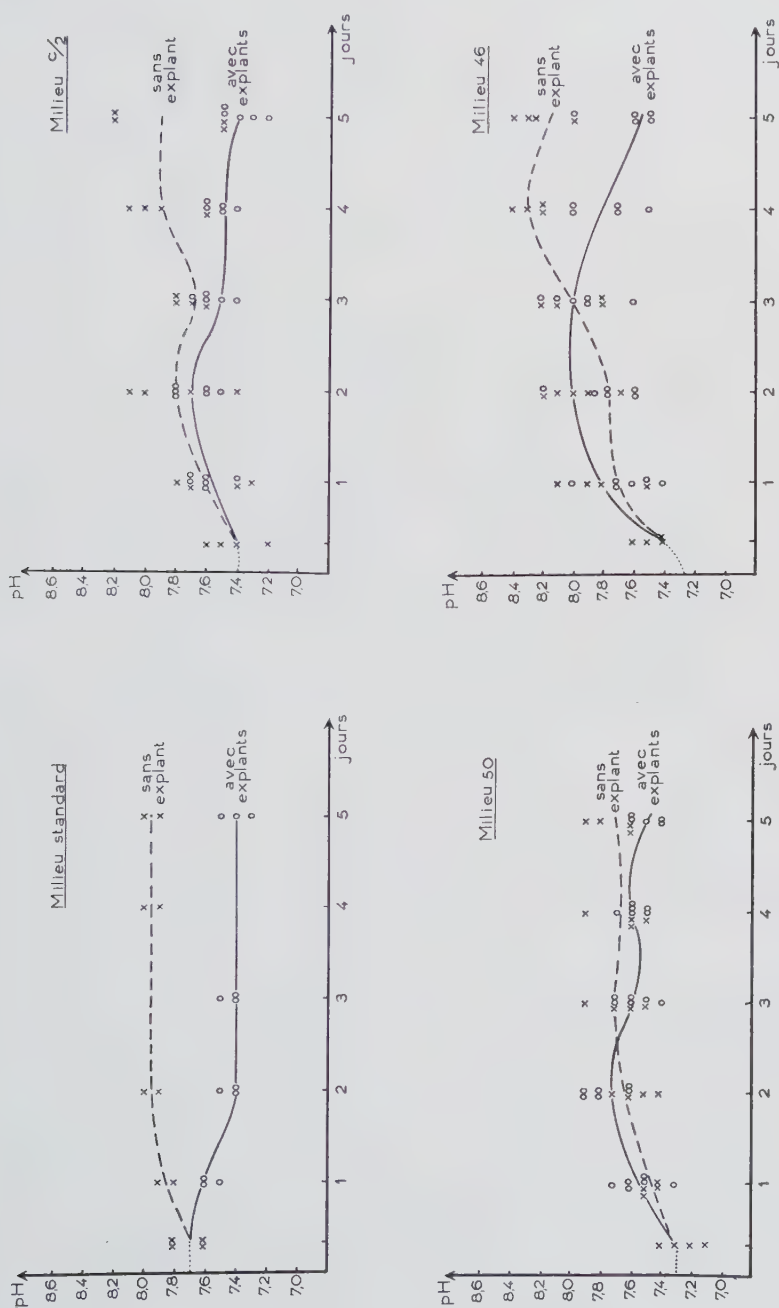


FIG. 26. — Evolution du pH des milieux standard, C/2, 50 et 46, en fonction de la durée de culture.

TABEAU VIII
INFLUENCE DE LA CYSTÉINE ET DE LA MÉTHIONINE SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES DE L'EMBRYON DE
CANARD PRÉLEVÉES À LA FIN DU 8^e JOUR DE L'INCUBATION

Numéro milieu	Acides aminés éprouvés	Concentration en mg pour 100 cm ³ de Tyrode	Nombre total d'explants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles				Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles				
					Testicules avec c. g.	Testicules peu évolués	Structures indifférenciées	Nécroses		Ovaires	Ovaires peu différenciés	Structures indifférenciées	Nécroses	
27	Cystéine.	6	42	20	2	1	—	13	4	22	18	3	1	—
33	Méthionine.	5,2	30	14	1	—	2	8	3	16	14	—	2	—
35	Cystéine. Méthionine.	6 5,2	34	21	8	1	7	4	1	13	12	1	—	—
50	Témoin. —	—	24	13	6	3	—	2	2	11	9	1	—	1

Plus récemment, BETKER et WORZNIAK (1952) ont reconnu la validité de cette observation pour toute substance aminée contenant un groupement sulhydryl : cystéine, méthionine ou glutathion.

KIELER (1954 *a*) a démontré la nécessité d'incorporer de la méthionine à des milieux dialysés pour stimuler la prolifération des fibroblastes cultivés sur ces milieux.

MORGAN et MORTON (1955) ont insisté sur le fait que la survie des fibroblastes de cœur d'embryons de Poulet, cultivés en milieux synthétiques, est optimum lorsque la cystéine et la méthionine sont présentes simultanément dans le milieu.

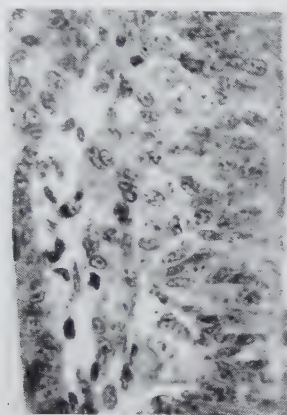


FIG. 27.

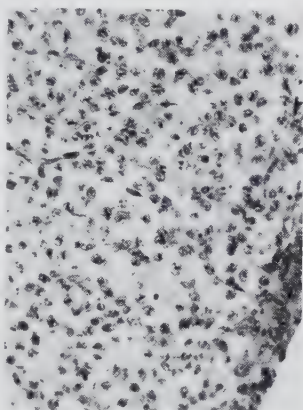


FIG. 28.

FIG. 27. — Détail d'un ovaire de Canard, différencié sur le milieu 27 à partir d'une ébauche indifférenciée de 7 1/2 jours. Structure caractéristique. Cortex partiellement stérile. (Gr. : $\times 455$.)

FIG. 28. — Détail d'une gonade ♂ prélevée à 8 jours d'incubation, après 5 jours de culture sur le milieu 27. Les cordons médullaires demeurent à l'état indifférencié. (Gr. : $\times 280$.)

Nos propres observations, que nous relations au début de ce chapitre, nous ont incités à préciser le rôle des acides aminés sulfhydrylés dans la nutrition des gonades embryonnaires cultivées en milieu synthétique.

Nous nous proposons d'étudier, successivement, l'influence de la cystéine et de la méthionine sur la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de Canard, d'une part, lorsqu'elles sont employées seules et, d'autre part, lorsqu'elles sont éliminées d'un mélange d'acides aminés.

Les gonades sont prélevées à la fin du 8^e jour de l'incubation. Les gonades gauches sont cultivées en milieu synthétique, les gonades droites en milieu standard. La durée de culture est de 5 jours. Les concentrations des acides aminés utilisés figurent dans le tableau VIII. Des gonades gauches sont cultivées sur le milieu 50 à titre de témoins.

Les acides aminés, cystéine et méthionine, employés isolément, sont très favorables à la différenciation des gonades femelles. Celles-ci se différencient en ovaires plus ou moins fertiles (fig. 27). Mais ils ne permettent qu'exceptionnellement la différenciation testiculaire de la médullaire qui demeure à l'état de cordons indifférenciés (fig. 28). L'épithélium germinatif a le plus souvent disparu. Tantôt les explants sont entourés d'un épithélium très aplati, tantôt ils sont partiellement dépourvus d'une membrane de bordure.

La présence simultanée de ces deux acides aminés permet, au contraire, l'évolution normale des testicules dans une proportion presque aussi élevée que le permet le milieu composé de 5 acides aminés, le milieu 50.

L'élimination de la cystéine du milieu 50 entraîne la dégénérescence des gonades à partir du 2^e jour de culture. L'élimination de la méthionine est sans effet sur la survie, mais elle exerce une action défavorable sur la différenciation morphologique des gonades mâles et femelles. Notons encore que le glutathion, à la concentration de 2 mg pour 100 cm³ de Tyrode, peut se substituer à ces deux acides aminés au point de vue de la survie et de la différenciation morphologique des gonades.

C. — AMÉLIORATION DU MILIEU MINIMUM 46 CHEZ L'EMBRYON DE POULET

Les recherches, que nous exposerons à présent, ont été effectuées chez l'embryon de Poulet. Rappelons que les gonades d'embryons de Poulet, cultivées sur le milieu standard et sur les milieux synthétiques complexes, évoluent d'une manière typique dans le cas du sexe mâle, d'une manière aberrante dans le cas du sexe femelle. Les ovaires évoluent en ovotestis, les gonades droites femelles ne subissent pas la régression, mais se différencient en organes de type testiculaire. Nous avons observé une moins bonne différenciation morphologique des gonades et des structures histologiques moins évoluées sur le milieu B/2 que sur le milieu C/2 (voir chapitre III).

1° *Différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de Poulet cultivées sur les milieux synthétiques 46 et 50.*

Les gonades gauches et droites d'un même embryon sont cultivées simultanément sur le milieu synthétique. Elles sont placées dans la position qu'elles occupaient dans l'embryon. Au stade du prélèvement (7 jours 1/2 d'incubation), l'aspect morphologique permet déjà de prévoir le sexe des gonades. La distinction devient aisée après quelques jours de culture. Les ovaires s'aplatissent sur le milieu et s'entourent d'une frange

TABLEAU IX

DIFFÉRENCIATION MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DES GONADES EMBRYONNAIRES DE POULET
CULTIVÉES SUR LES MILIEUX SYNTHÉTIQUES 46 ET 50

Milieu	Nombre de gonades explantées		Stade du prélèvement en jours	Durée de culture en jours	Différenciation des gonades mâles						Différenciation des gonades femelles						
					Morphologique				Histologique		Morphologique		Histologique				
					Testicules		Testicules peu différenciées										
	Gauches	Droites	Gauches	Droites	Gauches	Droites	Gauches	Droites	Gauches	Droites	Cortex épais	Cortex mince	Ovotestis	Gonades droites femelles			
46	15	15	7 1/2	7	6 boyaux.	6 boyaux.	4	2	2	4	9 gonades aplatis frangées.	9 petits boyaux aplatis.	5	4	5	2	2
50	12	12	7 1/2	7	5 boyaux.	5 boyaux.	3	4	2	1	7 gonades aplatis frangées.	7 petits boyaux aplatis.	5	2	4	2	1
Témoin, B/2	14	14	7 1/2	7	6 boyaux.	6 boyaux.	3	2	3	4	8 gonades aplatis frangées.	8 petits boyaux aplatis.	2	6	3	2	3

transparente, les testicules prennent la forme de boyaux cylindriques et renflés.

L'étude histologique montre que les gonades mâles, cultivées sur les milieux 46 et 50, présentent les mêmes structures testiculaires plus ou moins évoluées que sur le milieu B/2. Les gonades gauches femelles sont des ovotestis plus typiques, grâce au cortex souvent épais et bien développé. Les gonades droites femelles sont tantôt testiculaires, tantôt indifférenciées ou nécrosées (tableau IX) (fig. 29 et 32).

Nous tenterons à présent de préciser si d'autres acides aminés ont une action spécifiquement favorable à la survie et à la différenciation sexuelle des gonades de l'embryon de Poulet de 7 jours 1/2 d'incubation.

Nous maintenons le milieu 46 comme milieu de base pour cette étude, parce qu'il répond aux besoins minimums d'une autre catégorie d'organes embryonnaires de Poulet, la syrinx, et qu'il est voisin du milieu de base favorable à la croissance des tibias (M. KIENY, K. STENGER-HAFFEN et EM. WOLFF, 1954). Au total, 18 acides aminés sont ajoutés un à un et à diverses concentrations au milieu de base 46. Les concentrations initiales que nous avons essayées sont celles du milieu C/2. Seuls figurent, dans le tableau X, les résultats qui correspondent à la concentration optimum de l'acide aminé ajouté au milieu de base 46.

2° Sélection des acides aminés favorables à la survie.

Nous nous proposons de rechercher, d'abord, les acides aminés favorables à la survie prolongée des gonades, au-delà des limites respectées jusqu'à présent. La durée de culture a été prolongée jusqu'à 13 jours. La survie est appréciée d'après des critères morphologiques qui apparaissent dès les premiers jours de culture et qui sont : la cicatrisation des lésions subies au moment du prélèvement, l'aspect renflé et translucide des testicules, l'aspect aplati et frangé des ovaires.

Lorsqu'un organe se nécrose, il devient opaque et blanchâtre. On voit se former autour de lui une auréole de cellules nécrosées qui s'accroît les jours suivants. Finalement, l'organe se désagrège et perd son intégrité.

Le nombre d'organes sains et bien développés est noté après 2, 4, 8 et 13 jours de culture. Les résultats montrent que, dans la majorité des cas, l'addition au milieu de base 46, de l'un ou de l'autre des acides aminés, n'a pas d'influence sur la survie des gonades. Les différences que l'on observe, entre le milieu de base et le milieu additionné d'un acide aminé supplémentaire, ne sont pas statistiquement significatives. L'ornithine est le seul acide aminé qui améliore la valeur du milieu au point de vue de la survie ($P < 0,01$). Dans le cas de la proline, la faible valeur de P , bien que supérieure à 0,05, permet tout de même de penser que cet acide aminé exerce une certaine action défavorable à la survie (tableau X).

TABLEAU X

INFLUENCE DES ACIDES AMINÉS AJOUTÉS AU MILIEU 46
SUR LA SURVIE DES GONADES DE L'EMBRYON DE POULET
DE 7 JOURS 1/2 D'INCUBATION

Acide aminé éprouvé	Concentration en mg pour 100 cm ³ de Tyrode	Milieu 46 additionné d'un acide aminé éprouvé		Milieu 46 témoin des séries expérimentales		P	Valeur de l'acide aminé + = - (1)
		Nomb. d'ex-plants	Durée de survie moy. en jours	Nomb. d'ex-plants	Durée de survie moy. en jours		
Ornithine.	2	22	12,8	18	10	<0,01	+
Thréonine.	8	20	12,5	13	11,5	0,4 <P<0,5	=
Acide aspartique.	3	16	12,1	12	11,3	0,4 <P<0,5	=
Glycocolle.	5	19	12	17	10,9	0,2 <P<0,3	=
Asparagine.	2	23	12,2	15	12,1	—	=
Valine.	2	12	12,5	23	10,7	0,1 <P<0,2	=
Phénylalanine.	8	19	11,4	17	10,5	0,4 <P<0,5	=
Hydroxyproline.	2	23	11,8	15	11,7	—	=
Acide glutamique.	28,2	12	12,1	12	11,3	0,4 <P<0,5	=
Tryptophane.	2	22	11,3	18	10,3	0,3 <P<0,4	=
Proline.	4	17	11,3	15	12,7	0,05 <P<0,1	—
Taurine.	2	16	10,9	12	11,8	0,4 <P<0,5	=
Sérine.	2	12	11,1	15	12,1	0,4 <P<0,5	=
Glutathion.	1	18	11,1	21	11,4	—	=
Glutamine.	2	17	10,1	13	11,1	0,6 <P<0,5	=
Tyrosine.	0,5	22	10,1	21	10,3	P<0,9	=
Leucine.	2	26	10,2	26	10,8	0,6 <P<0,5	=
Isoleucine.	4	23	10,5	26	10,8	—	=

(1) + acide aminé favorable; — acide aminé défavorable.

3° Sélection des acides aminés favorables à la différenciation.

Les gonades gauches prélevées à 7 jours 1/2 d'incubation sont cultivées en milieu synthétique. Les gonades droites évoluent en milieu standard. La durée de culture est de 7 jours.

Dans ces expériences, nous prendrons, comme critère de la différenciation femelle, l'épaisseur du cortex des ovotestis. L'évolution des tubes testiculaires des gonades gauches mâles sera comparée à celle de leur partenaire droit cultivé en milieu standard. D'autre part, des témoins ont été prélevés au début de l'expérience pour permettre de comparer la structure des gonades au début (fig. 4 et 5) et à la fin de la culture.

L'investigation histologique nous a permis de sélectionner un certain nombre d'acides aminés particulièrement favorables à la différenciation des explants des deux sexes. Ce sont : l'hydroxyproline, l'ornithine, le

TABLEAU XI. — INFLUENCE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS AJOUTÉS AU MILIEU 46 SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES DE L'EMBRYON DE POULET DE 7 JOURS 1/2 D'INCUBATION

Acide aminé éprouvé	Concentration en mg pour 100 cm ³ de Tyrode	Différenciation des gonades femelles après 7 jours de culture			Gonades droites plus ou moins testiculaires	Différenciation des gonades mâles après 7 jours de culture				Gonades nécrosées						
		Ovotestis		Cortex inexistante. Médullaire étroite, allongée		Testicules gauches		Testicules droits		Gauches	Droites					
		Cortex bien développé	Cortex mince			Typiques	Peu évolués	Indifférenciées	Typiques			Peu évolués	Indifférenciées			
Hydroxyproline.	2	6	—	—	6	4	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—
Ornithine.	2	3	1	—	6	4	—	1	—	4	2	—	—	—	—	—
Glycocolle.	5	5	—	1	6	5	—	3	—	6	1	—	1	—	—	—
Glutamine.	2	5	1	1	7	5	—	—	—	5	1	—	—	—	—	—
Tryptophane.	2	5	—	2	7	4	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—
Phénylalanine.	8	5	3	2	10	5	—	1	—	4	2	—	1	—	—	—
Thréonine.	8	2	3	1	6	3	—	—	—	3	2	2	—	—	—	—
Glutathion.	1	3	3	4	7	2	—	—	—	3	2	2	—	—	—	—
Valine.	2	2	2	3	7	3	—	—	—	4	2	2	—	—	—	—
Asparagine.	2	2	1	4	7	3	—	—	—	2	2	2	—	—	—	—
Taurine.	2	2	2	1	5	1	—	1	—	3	2	2	—	—	—	—
Sérine.	2	—	4	—	4	1	—	2	—	4	1	1	—	—	—	—
Acide aspartique.	3	2	1	5	9	1	—	2	—	2	2	2	—	—	—	—
Tyrosine.	0,5	1	2	1	4	4	—	2	—	4	1	1	—	—	—	—
Proline.	4	—	2	2	4	2	—	3	—	5	3	—	—	—	—	—
Isoleucine.	28,2	1	1	—	3	—	—	1	—	1	1	1	—	—	—	—
Leucine.	4	1	—	7	8	1	—	2	—	3	1	1	—	—	—	—
Témoins.																
Milieu 46.	—	3	5	—	8	2	—	3	—	4	1	1	—	—	—	—
Milieu 46 + Hy., Thr., O., Gly., Ph. (1).	—	3	2	1	6	5	—	1	—	6	2	—	—	—	—	—
Milieu 134 (2).	—	3	2	—	5	6	—	—	—	4	2	—	—	—	—	—

(1) *Hy.*, hydroxyproline; *Thr.*, thréonine; *O.*, ornithine; *G.*, glutamine; *T.*, tryptophane; *Gly.*, glycocolle; *Ph.*, phénylalanine.

(2) Milieu 134 : milieu composé des acides aminés du Milieu C aux nouvelles concentrations. Il contient, en plus, la glutamine et le glutathion.

(1) Hy., hydroxyproline; Thr., thréonine; O., ornithine; G., glutamine; T., tryptophane; Gly., glycocolle; Ph., phénylalanine.
 (2) Milieu 134 : milieu composé des acides aminés du Milieu C aux nouvelles concentrations. Il contient, en plus, la glutamine et le glutathion.

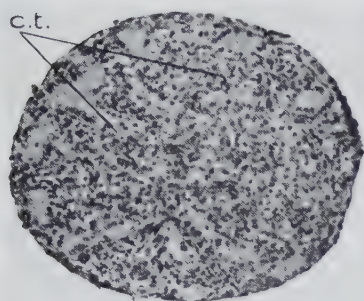


FIG. 29.

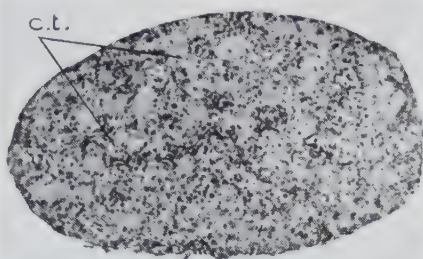


FIG. 30.

FIG. 29 et 30. — Gonades gauches d'embryons de Poulet de 7 1/2 jours d'incubation, différenciées après 7 jours de culture. Noter les cordons testiculaires, plus élargis sur le milieu 46 additionné d'ornithine (fig. 29) que sur le milieu 46 témoin (fig. 30).

c. t., cordons testiculaires. (Gr. : $\times 100$.)

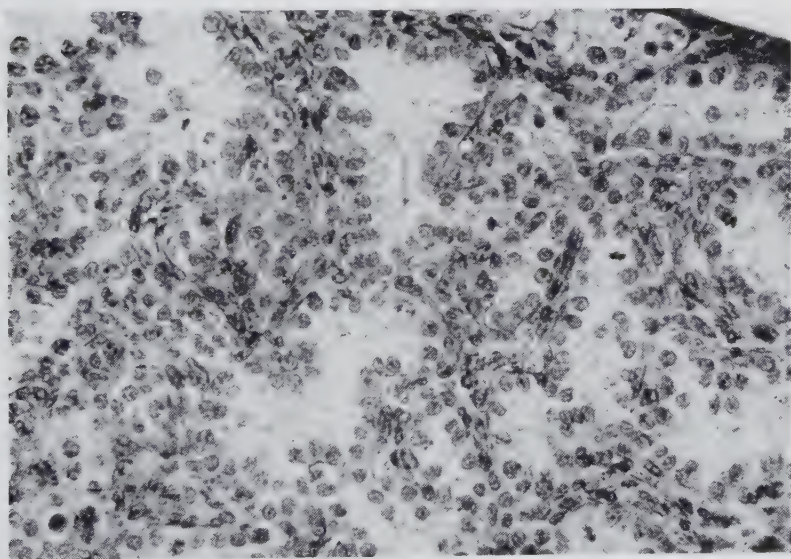


FIG. 31. — Détail d'un testicule d'embryon de Poulet, prélevé au stade différencié (9 jours), après 14 jours de culture sur le milieu 46 additionné d'hydroxyproline. On remarque l'aspect sain et très différencié de l'organe. (Gr. : $\times 440$.)

glycocolle, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine et la thréonine (tableau XI). Les gonades mâles évoluent en testicules caractéristiques (fig. 29, 30 et 31), fertiles dans la majorité des cas. Ils diffèrent peu des tes-

ticules cultivés sur le milieu standard. Les gonades femelles acquièrent la structure d'ovotestis aussi différenciés que ceux cultivés sur le milieu standard. Le cortex bien développé, souvent fertile, est nettement séparé de la médullaire testiculaire par une membrane basale (fig. 32 et 33). On rencontre des mitoses dans les deux parties de la gonade.

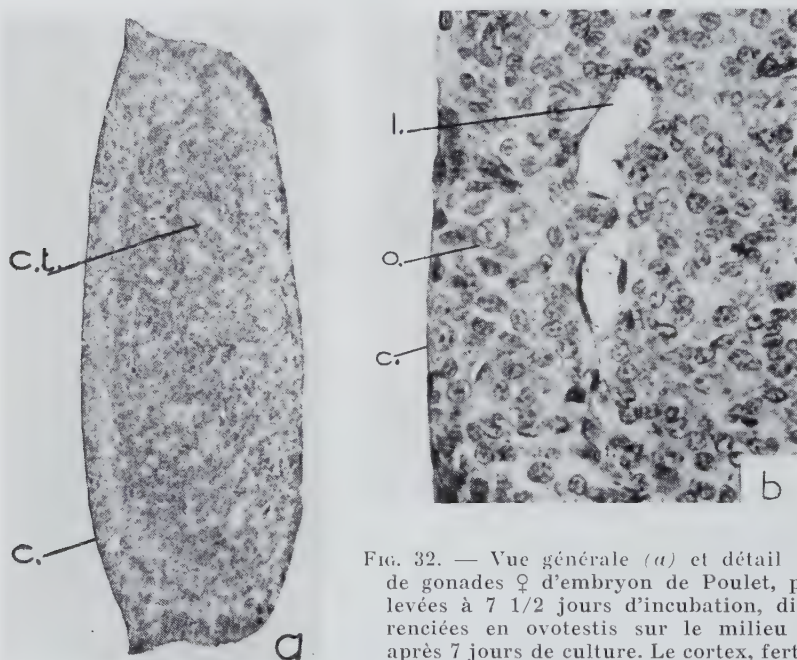


FIG. 32. — Vue générale (a) et détail (b) de gonades ♀ d'embryon de Poulet, prélevées à 7 1/2 jours d'incubation, différenciées en ovotestis sur le milieu 46, après 7 jours de culture. Le cortex, fertile, recouvre une importante zone médullaire formée de cordons testiculaires (a). La

figure b montre des lacunes isolées qui s'insèrent entre le cortex et la médullaire.

c. t., cordons testiculaires; c., cortex; l., lacunes; o., ovogonies. (Gr. : $\times 160$ et 540.)

L'addition au milieu 46 des acides aminés suivants : taurine, proline, sérine, valine, tyrosine, glutathion semble indifférente. Les deux catégories d'explants acquièrent des structures plus ou moins évoluées.

Notons enfin que l'asparagine, l'acide aspartique et la leucine semblent diminuer la valeur du milieu de base pour la différenciation des gonades femelles. On observe fréquemment, sur ces milieux, des ovotestis à cortex très peu développé ou même inexistant.

Il est intéressant de constater qu'un mélange d'acides aminés, recomposé à partir des plus efficaces, ne se révèle pas plus favorable à la diffé-

renciation des gonades embryonnaires de Poulet, que l'un ou l'autre des acides aminés ajouté isolément au milieu de base. Il en est de même du milieu 134, dans lequel figure la totalité des acides aminés du milieu C/2 employés aux nouvelles concentrations et qui contient, en plus, la glutamine et le glutathion (voir tableau X).

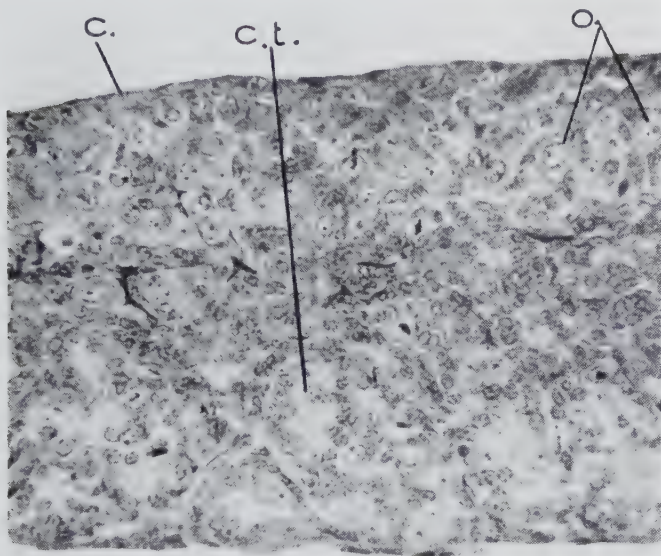


FIG. 33. — Détail d'une gonade ♀ prélevée à 7 1/2 jours d'incubation, différenciée en ovotestis sur le milieu 46 additionné de glycoColle. Noter le cortex ovarien très épais qui contient de nombreuses ovogonies et les cordons testiculaires également fertiles.

c. t., cordons testiculaires; *c.*, cortex; *o.*, ovogonies. (Gr. : $\times 420$.)

D. — AMÉLIORATION DU MILIEU 50 CHEZ L'EMBRYON DE CANARD

L'analyse systématique des constituants du milieu C/2 a montré qu'un certain nombre d'acides aminés, sans être indispensables, sont cependant spécifiquement favorables à la différenciation des gonades des deux sexes de l'embryon de Poulet. Ce sont : l'hydroxyproline, l'ornithine, le glycoColle, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine et la thréonine. Ces acides aminés peuvent se substituer l'un à l'autre et il n'est pas nécessaire de les incorporer en groupe, au milieu 46, pour obtenir un milieu aussi favorable que le milieu C/2.

Rappelons que le milieu minimum le plus favorable aux gonades embryonnaires de Canard, auquel ont abouti nos premières recherches,

TABLEAU XII. — INFLUENCE DE CERTAINES COMBINAISONS D'ACIDES AMINÉS
SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD PRÉLEVÉES AU 8^e JOUR DE L'INCUBATION

Numéro du milieu synthé- tique	Acides aminés (1) ajoutés au milieu 50	Durée de culture en jours	Nombre total d'explants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles			Nombre de gonades droites féminelles	Différenciation des gonades gauches femelles		
					Testicules	Testicules peu évolués	Structures indiffé- renciées		Ovaires (2)	Structure histo- logique	Structures indiffé- renciées
					avec é. g.						
154**	O., Thr., Hy., Gly.	5	28	14	1	5	—	5	—	12	2
151**	O., Thr., Hy., Gly. T., Ph., G.	5	13	6	2	3	1	—	1	6	—
151**	O., Thr., Hy., Gly. T., Ph., G.	8	13	5	3	2	—	—	5	3	—
152*	O., Thr., Hy., Gly.	5	22	11	—	3	2	2	—	11	—
153*	O., Thr., Hy., Gly. T., Ph., G.	5	22	9	2	—	—	1	—	12	1
	Témoins.										
50	—	5	22	16	—	5	—	—	—	—	—
50	—	8	9	1	1	5	2	4	3	3	—
C/2	—	5	22	12	1	9	—	—	8	8	—
C/2	—	8	11	6	5	1	—	—	5	2	—

* Les acides aminés sont employés aux concentrations du milieu C/2 (voir chapitre I).

** Les acides aminés sont employés aux nouvelles concentrations qui figurent au tableau IX.

(1) O., ornithine; Thr., thréonine; Hy., hydroxyproline; Gly., glycocolle; T., tryptophane; Ph., phénylalanine; G., glutamine.

(2) Dans la plupart des cas, l'aspect morphologique a été contrôlé par l'histologie.

est constitué de 5 acides aminés : la cystéine, la méthionine, l'arginine, l'histidine et l'acide glutamique (milieu 50). Ce milieu apparaît aussi efficace que le milieu C/2 au point de vue de la différenciation femelle, non à celui de la différenciation mâle.

Nous avons essayé d'ajouter à ce milieu l'un ou l'autre des acides aminés précédemment sélectionnés, mais aucun d'entre eux n'a franchement amélioré la différenciation testiculaire des explants cultivés sur le milieu 50. Les gonades mâles de cette espèce d'Oiseau semblent avoir de plus grandes exigences nutritives que les gonades de l'embryon de Poulet. Nous nous sommes donc proposé d'étudier l'efficacité des 7 acides aminés précédemment sélectionnés, ajoutés en groupes au milieu 50. Quatre combinaisons d'acides aminés, qui diffèrent entre elles, d'une part par le nombre d'acides aminés, d'autre part par leurs concen-

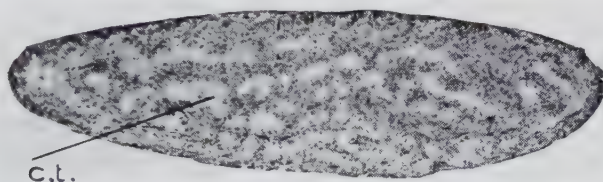


FIG. 34. — Vue générale d'un testicule d'embryon de Canard, prélevé à 7 1/2 jours d'incubation, différencié sur le milieu 151, après 7 jours de culture. Noter la structure évoluée des cordons testiculaires. (Gr. : $\times 115$.)

trations, ont été réalisées. La composition des différents milieux figure au tableau XI.

Les gonades gauches de l'embryon de Canard, prélevées au début du 8^e jour de l'incubation, sont cultivées pendant 5 à 8 jours sur les milieux synthétiques. Les gonades droites évoluent en milieu standard.

L'addition, au milieu 50, d'un groupe de 4 acides aminés : ornithine, hydroxyproline, thréonine et glycocolle (milieux 150 et 152), n'améliore pas sa valeur au point de vue de la différenciation des gonades mâles. Il n'en est pas de même du milieu 151. En effet, ce milieu composé de 12 acides aminés, parmi lesquels figurent, en plus des acides aminés précités, la glutamine, le tryptophane et la phénylalanine, apparaît aussi efficace que le milieu C/2 au point de vue de la différenciation testiculaire des gonades (tableau XII). Dans presque tous les cas, la différenciation de la médullaire s'effectue normalement. Celle-ci acquiert une structure très évoluée (fig. 34). On constate qu'un épithélium germinatif plus ou moins épais recouvre partiellement les explants cultivés pendant 5 jours. Il en est de même de certains explants cultivés pendant 8 jours;

toutefois, la majorité des testicules différenciés sur le milieu C/2, après 8 jours de culture, en est dépourvue.

Il semble que la prolongation de la durée de culture peut, dans certains cas, faire disparaître l'épithélium germinatif qui persiste autour d'une gonade très différenciée en testicule.

Il convient de remarquer également le rôle important de la concentration des acides aminés d'un milieu. Des faibles concentrations sont plus efficaces que des concentrations élevées. Ainsi le milieu 153, qui diffère uniquement du milieu 151 par la concentration plus élevée de ses constituants, se révèle moins favorable que ce dernier à la différenciation des gonades mâles. On observe la même différence entre le milieu 152 et le milieu 154.

En définitive, nous arrivons à la définition d'un milieu synthétique (milieu 151) qui apparaît aussi efficace que le milieu C/2 au double point de vue de la survie et de la différenciation des gonades des deux sexes. Il est constitué de 12 acides aminés parmi lesquels figurent un acide aminé indispensable, la cystéine, 4 acides aminés essentiels, la méthionine, l'arginine, l'histidine, l'acide glutamique et 7 acides aminés favorables, l'hydroxyproline, l'ornithine, le glycocolle, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine et la thréonine.

E. — CONCLUSION

Nous avons procédé à l'analyse des besoins nutritifs des gonades. Cette étude a eu pour point de départ les milieux synthétiques B/2 et C/2, composés d'un nombre relativement élevé d'acides aminés. Simultanément, EM. WOLFF (1953 *a*-1957) et M. KIENY (1953 *a*-1958) ont analysé les besoins nutritifs d'autres organes embryonnaires de Poulet : la syrinx et les tibias. Les recherches que nous venons d'exposer ont trait aux besoins particuliers des gonades, mais il est intéressant de comparer les résultats à ceux obtenus par ces deux auteurs. Si les gonades présentent des exigences spécifiques, elles n'ont pas moins des besoins communs aux deux autres catégories d'organes.

Les gonades ne peuvent survivre en l'absence d'un acide aminé sulfhydrylé, la cystéine. Il en est de même de la syrinx, non du tibia. Employées isolément, la cystéine et la méthionine permettent la survie et la différenciation des gonades femelles, mais elles ne suffisent pas aux gonades mâles. La différenciation de cette catégorie d'organes est favorisée par la présence simultanée de ces deux acides aminés. D'autres acides aminés, favorables au développement des gonades femelles, stimulent la différenciation testiculaire. Ce sont : l'arginine, l'histidine, l'acide glutamique, la lysine. Mais il est nécessaire de les associer d'une manière très précise,

car ces composés n'additionnent pas toujours leurs effets favorables. Leur action peut être antagoniste. Une certaine combinaison d'acides aminés peut se révéler néfaste, tantôt à la survie, tantôt à la différenciation. Ainsi l'arginine, associée à la cystéine et à la méthionine, affecte la survie des explants génétiquement mâles. En présence des 3 acides aminés précités, les associations lysine-acide glutamique ou lysine-acide glutamique-histidine inhibent la différenciation. Par contre, les associations histidine-acide glutamique ou lysine-histidine se révèlent favorables.

C'est ainsi que nous sommes arrivés à définir un milieu minimum, favorable au développement des gonades de l'embryon de Canard (milieu 50). Il est composé de cystéine, comme acide aminé indispensable, de méthionine, d'arginine, d'histidine, d'acide glutamique, comme acides aminés essentiels. La lysine peut se substituer à l'acide glutamique (milieu 46). Ce dernier milieu représente le milieu minimum favorable au développement des gonades et des syrinx embryonnaires de Poulet. Il est analogue à celui des tibias qui nécessitent, en outre, l'acide glutamique et l'acide para-aminobenzoïque.

Les gonades ont des besoins sensiblement plus proches de ceux de la syrinx que de ceux du tibia. Ceci peut s'expliquer par le fait que, chez les gonades et les syrinx, on satisfait aux exigences d'une différenciation, alors que, chez les tibias, on satisfait à celles de la croissance.

Nous avons qualifié les milieux 50 ou 46 de « milieux minimums ». Quels sont les composés susceptibles de les améliorer ? L'analyse systématique d'autres constituants du milieu C/2 a permis de sélectionner un certain nombre d'acides aminés qui agissent favorablement sur la survie et sur la différenciation des gonades embryonnaires de Poulet. Seule, l'ornithine agit simultanément sur ces deux critères. L'hydroxyproline, le glyocolle, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine et la thréonine améliorent uniquement la différenciation.

Le glyocolle et la phénylalanine figurent parmi les acides aminés qui favorisent la différenciation des syrinx. L'ornithine, la thréonine et l'hydroxyproline améliorent la croissance des tibias et des syrinx.

Dans le cas des gonades de l'embryon de Poulet, ces acides aminés, ajoutés au milieu minimum, peuvent se substituer l'un à l'autre. Il n'en est pas de même chez l'embryon de Canard où il est nécessaire de les ajouter en groupe. Les besoins de ces deux espèces d'Oiseau ne sont pas rigoureusement égaux. On remarque qu'en culture *in vitro* les gonades embryonnaires de Poulet acquièrent des structures différentes de celles des gonades embryonnaires de Canard. La différenciation des gonades femelles est aberrante dans la première catégorie. La différenciation des gonades mâles se réalise moins aisément dans la seconde. Cette différence dans la nature de la différenciation peut être due à une certaine divergence des besoins nutritifs des deux espèces.

Toujours est-il que ces recherches ont abouti à l'élaboration de milieux synthétiques réduits, aussi favorables que le milieu C/2 à la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de deux espèces d'Oiseau. Ils sont composés, soit de 6, soit de 12 acides aminés, suivant qu'ils satisfont les besoins des gonades embryonnaires de Poulet ou de Canard.

La présence dans un milieu synthétique des acides aminés suivants : asparagine, leucine, valine, isoleucine, sérine, acide aspartique, proline, taurine et tyrosine ne se révèle pas nécessaire.

V. — ÉTUDE DES BESOINS EN HYDRATES DE CARBONE DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD CULTIVÉES EN MILIEU SYNTHÉTIQUE

A. — RÔLE DU GLUCOSE

Nous avons montré (chapitre III) que les gonades embryonnaires de Poulet et de Canard, explantées avant ou après le stade de la différenciation sexuelle sur un milieu dépourvu de toute substance ternaire ou quaternaire (milieu T_[0]), subissent la nécrose totale en l'espace de 24 heures.

Nous avons aussi montré que, si l'on incorpore du glucose au substratum de base (milieu T), les gonades, prélevées à un stade avancé du développement (9 et 10 jours d'incubation), survivent pendant quelques jours et continuent dans certains cas leur différenciation si celle-ci est fortement amorcée au moment de l'explantation (ovaires d'embryons de Poulet et de Canard, testicules d'embryons de Poulet). Il était intéressant de connaître l'évolution des gonades explantées sur des milieux dépourvus de glucose, mais qui contiennent des substances azotées, en l'espèce, de l'extrait d'embryon ou un mélange d'acides aminés.

1° Culture de gonades embryonnaires de Canard sur un milieu à base d'extrait embryonnaire, sans glucose (milieu standard_[0]).

Les gonades indifférenciées de l'embryon de Canard de 7 1/2 à 8 jours d'incubation survivent et se développent aussi bien sur le milieu standard dépourvu de glucose que sur le milieu standard glucosé habituel. Sur 24 gonades explantées, nous avons obtenu 10 testicules, 7 ovaires, 7 gonades droites femelles parfaitement différenciées après 5 jours de culture. Ces résultats prouvent que les tissus embryonnaires contiennent une quantité suffisante de glucose. En effet, le taux du glucose d'embryons de Poulet de 9 à 12 jours d'incubation est voisin de 1 ‰ (résultats inédits d'analyses effectuées au laboratoire par M. HAAG).

2° Culture de gonades embryonnaires de Canard
en milieu synthétique sans glucose (milieu 50_[O]).

Des gonades du même âge, explantées sur un milieu composé exclusivement de sels minéraux et d'un mélange d'acides aminés favorables, tels que cystéine, méthionine, arginine, histidine et acide glutamique (milieu 50_[O]), se nécrosent totalement en l'espace de 24 heures de culture. Il en est de même des gonades de l'embryon de Poulet et d'autres organes, tels que la syrinx et les tibias (M. KIENY, K. STENGER-HAFFEN, EM. WOLFF, 1953).

Ces expériences montrent le rôle primordial du glucose dans la nutrition des organes cultivés *in vitro*. Un milieu de culture, dans lequel ne figurent que des acides aminés comme éléments nutritifs, est incompatible avec la survie des organes.

B. — ESSAIS DE REMPLACEMENT DU GLUCOSE PAR D'AUTRES GLUCIDES

Un certain nombre d'auteurs ont montré, sur des cultures organotypiques ou histiotypiques effectuées en milieux synthétiques (SPRATT, 1949; TROWELL, 1955), en milieux naturels (WORZNIAK, 1952; HARRIS et KUTZKI, 1953), que le mannose équivaut au glucose, mais que le fructose leur est inférieur.

Les gonades embryonnaires, cultivées *in vitro* en milieu synthétique, sont-elles capables d'assimiler d'autres hydrates de carbone que le glucose ? On peut, en repartant du substratum de base additionné d'un mélange d'acides aminés, qui est incompatible avec la survie des organes, faire varier à volonté le constituant ternaire du milieu. Nous disposons des critères habituels pour apprécier l'efficacité des différents glucides sur les gonades explantées : la survie et la différenciation attestées par l'aspect morphologique et histologique des gonades.

1° Etude des hexoses.

Les gonades gauches de l'embryon de Canard âgé de 7 1/2 à 8 jours d'incubation sont cultivées sur le milieu synthétique composé des 5 acides aminés suivants : cystéine, méthionine, arginine, histidine et acide glutamique. Le glucose du milieu est remplacé par du mannose, du galactose, du fructose ou du sorbose. Les gonades droites témoins sont explantées en milieu standard. La durée de culture varie de 5 à 7 jours.

A) INFLUENCE DES HEXOSES SUR LA SURVIE DES GONADES. — Aux concentrations 11,1 mM/l et 27,7 mM/l, le mannose assure le développement des gonades dans des conditions presque aussi favorables que le glucose

(fig. 35). Une faible proportion d'explants n'atteint pas la fin de la culture. La différenciation morphologique des gonades s'effectue d'une manière typique dans les deux sexes.

Le galactose est également bien toléré par les gonades qui survivent dans la majorité des cas et se différencient en ovaires et en testicules reconnaissables macroscopiquement. Cependant, ce glucide exerce une légère action inhibitrice sur la croissance, estimée d'après les dimensions des explants.

Le fructose se révèle moins favorable à la survie de 5 jours des gonades.

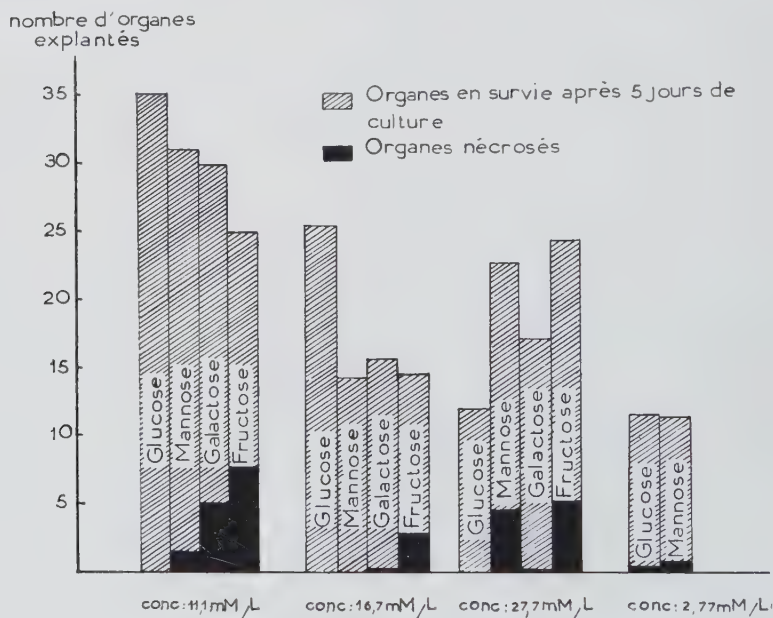


FIG. 35. — Influence des hexoses sur la survie des gonades de l'embryon de Canard. Milieu synthétique 50.

De plus, il exerce un effet inhibiteur nettement plus marqué sur la croissance que le galactose. Après 5 jours de culture, la taille des gonades est approximativement réduite de moitié par rapport à celle des gonades qui évoluent sur un milieu à base de glucose ou de mannose.

Le sorbose n'est pas assimilé. Il paraît même toxique. Quelques heures après la mise en culture, les gonades présentent un aspect opaque et blanc; elles s'entourent d'une auréole de nécrose qui progresse rapidement vers le centre de l'organe. Après 12 heures de culture les organes sont complètement nécrosés. Il convient de remarquer que le sorbose provoque la nécrose d'une manière beaucoup plus rapide qu'un milieu synthétique dépourvu de toute substance ternaire.

Lorsque l'on augmente la concentration du glucose dans le milieu (27,7 mM/l), on ne change pas les conditions de survie et de différenciation morphologique. Il en est de même des autres hexoses. Il est intéressant de constater que les gonades s'accommodent fort bien d'une concentration élevée d'un glucide favorable. On peut augmenter la concentration du glucose jusqu'à 55,6 mM/l sans provoquer d'effet néfaste sur la survie. Il en est de même du mannose, du fructose ou du galactose.

Nous avons tenté de préciser quelle est la concentration minimum efficace d'un hexose. A la concentration de 2,77 mM/l, seuls le glucose et le mannose sont encore capables d'assurer une survie de 5 jours aux gonades. Dans le cas du galactose et du fructose, cette concentration se

Influence des hexoses sur la différenciation des gonades de l'embryon de Canard.
— milieu synthétique 50.

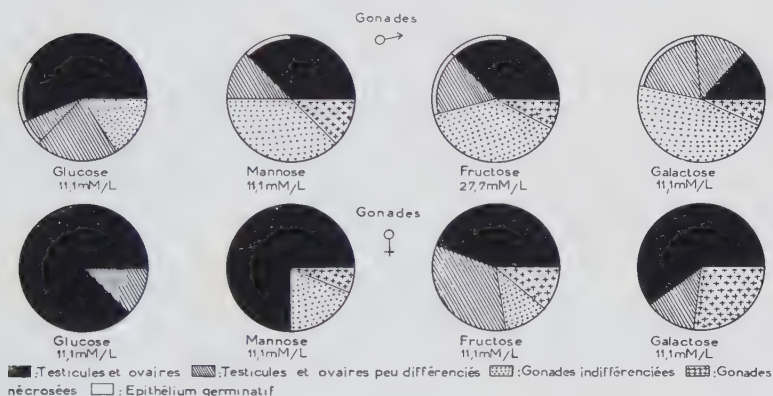


FIG. 36. — Influence des hexoses
sur la différenciation des gonades de l'embryon de Canard.
Milieu synthétique 50.

révèle nettement insuffisante. Les gonades ne survivent pas au-delà de 24 heures. L'effet nocif du sorbose s'observe encore à une faible concentration de l'ordre de 1,11 mM/l.

B. INFLUENCE DES HEXOSES SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES GAUCHES DE L'EMBRYON DE CANARD. — 1° *Différenciation sexuelle des gonades mâles*. — L'action des différents hexoses sur la différenciation sexuelle des gonades mâles peut se schématiser de la manière suivante :

$$\text{glucose} > \text{mannose} \geq \text{fructose} = \text{galactose}.$$

Les diagrammes (fig. 36) illustrent les résultats obtenus sur la différenciation des explants testiculaires cultivés en présence de différents hexoses. Ils sont établis pour la concentration optimum de chacun

TABLEAU XIII

INFLUENCE DES HEXOSES SUR LA DIFFÉRENCIATION DES GONADES GAUCHES DE L'EMBRYON DE CANARD

Hexose étudié	mM/l (1)	Nombre total d'expiants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles					Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles			
				Testicules		Testicules peu évolués		Structures indifférenciées	Nécroses		Ovaires peu différenciés	Structures indifférenciées	Nécroses
				avec é. g. (2)		avec é. g.							
Glucose.	11,1	35	19	8	3	4	1	3	—	16	14	—	—
Mannose.	11,1	32	16	4	2	2	—	6	2	16	12	3	1
Galactose.	11,1	30	15	2	—	2	3	7	1	15	2	—	4
Fructose.	11,1	25	16	1	—	2	—	6	7	9	3	1	1
Glucose.	16,7	26	14	5	1	3	1	4	—	12	11	—	—
Mannose.	16,7	14	7	2	—	3	—	2	—	7	6	1	—
Galactose.	16,7	16	8	1	—	3	—	1	1	8	3	1	—
Fructose.	16,7	14	8	—	—	5	1	5	2	6	2	—	1
Glucose.	27,7	12	6	1	—	2	—	3	—	6	5	—	—
Mannose.	27,7	23	10	2	2	1	—	4	1	13	10	—	3
Galactose.	27,7	17	11	1	1	—	1	8	—	6	2	1	1
Fructose.	27,7	24	13	3	2	—	2	5	1	11	3	2	4

(1) On appelle mM/l la concentration en millimolécule/gramme par litre.

(2) é. g., épithélium germinatif.

d'entre eux (tableau XIII). Sur le milieu à base de glucose, les gonades explantées se différencient en testicules typiques, acquièrent une structure intermédiaire ou ne se différencient pas, dans les proportions qui sont celles des gonades cultivées sur le milieu synthétique 50 (voir chapitre IV).

Malgré le petit nombre d'expériences, il semble que l'augmentation de la concentration exerce un effet inhibiteur sur la différenciation des cordons médullaires en cordons testiculaires.

Le mannose, à sa concentration optimum (11,1 mM/l), est moins favorable que le glucose à l'autodifférenciation des gonades mâles. Un nombre moins important d'explants acquiert une structure testiculaire aussi évoluée que celle des testicules différenciés sur un milieu glucosé. Dans certains cas, l'épithélium germinatif se maintient tandis que la médullaire évolue. De nombreux explants se différencient mal ou ne se différencient pas.

Le fructose ne permet pas la différenciation mâle aux faibles concentrations. L'augmentation de la concentration à 27,7 mM/l se révèle efficace. Les résultats sont comparables à ceux que l'on obtient avec le mannose : proportions sensiblement égales de différenciations testiculaires et d'arrêt de développement.

Les gonades, cultivées en présence de galactose, ne se différencient qu'exceptionnellement en testicules, quelle que soit la concentration des solutions. La grande majorité des explants subit un retard important dans son développement. Après 5 jours de culture, les cordons médullaires commencent seulement à acquérir la structure de cordons testiculaires.

2° *Différenciation sexuelle des gonades femelles.* — Quelle que soit la concentration utilisée, le mannose se révèle presque aussi efficace que le glucose à la différenciation des gonades femelles. Le galactose et surtout le fructose sont moins favorables au développement ovarien des explants. Les diagrammes illustrent ces résultats. Il est curieux de constater que la différenciation de cette catégorie de gonades qui, en général, se réalise aisément, même sur des milieux très peu nutritifs (chapitre IV), est influencée par la présence de l'un ou de l'autre de ces deux hexoses. Ces résultats démontrent une fois de plus que la différenciation des gonades femelles n'est pas liée automatiquement à une survie de l'organe.

2° Etude des disaccharides.

Parmi les disaccharides, le lactose n'est toléré à aucune des concentrations étudiées. Le maltose permet dans de rares cas la survie des explants. Le saccharose est assimilé à condition de l'incorporer au milieu, aux concentrations 16,7 mM/l et 27,7 mM/l. Il favorise la différenciation des

TABLEAU XIV

INFLUENCE DES DISACCHARIDES
SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES GAUCHES DE L'EMBRYON DE CANARD
DE 7 JOURS 1/2 D'INCUBATION

Disaccharide étudié	mM/l	Nomb. total d'ex-plants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles		Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles			
				Structures indifférenciées	Nécroses		Ovaires	Ovaires peu différenciés	Structures indifférenciées	Nécroses
Saccharose.	16,7	20	11	9	2	9	5	2	1	1
Maltose.	16,7	17	10	3	7	7	1	—	2	4
Lactose.	16,7	7	3	—	3	4	—	—	—	4
Saccharose.	27,7	20	9	9	—	11	6	—	3	2
Maltose.	27,7	6	2	—	2	4	—	—	—	4
Lactose.	27,7	6	3	—	3	3	—	—	—	3

Le milieu synthétique contient les acides aminés suivants : cystéine, méthionine, arginine, histidine, acide glutamique.

TABLEAU XV

INFLUENCE DE CERTAINS PENTOSE
SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD
DE 7 JOURS 1/2 D'INCUBATION

Pentose étudié	mM/l	Nomb. total d'ex-plants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles		Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles		
				Structures indifférenciées	Nécroses		Structures indifférenciées	Absence de cortex	Nécroses
Xylose.	11,1	12	8	5	3	4	—	2	2
Ribose.	11,1	13	6	—	6	7	—	2	5
Arabinose.	11,1	12	5	—	5	7	—	2	5
Xylose.	16,7	11	6	5	1	5	2	1	2
Ribose.	16,7	9	5	—	5	4	—	—	4
Arabinose.	16,7	8	4	—	4	4	2	—	2

Le milieu synthétique contient les acides aminés suivants : cystéine, méthionine, arginine, histidine, acide glutamique.

gonades femelles dans la moitié des cas, jamais celle des gonades mâles (tableau XIV). On constate que la croissance est considérablement inhibée. La taille des gonades reste sensiblement égale à celle qu'elles présentent au moment du prélèvement.

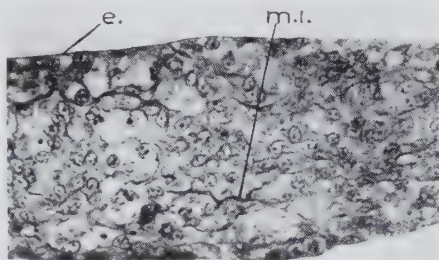
3° Etude des pentoses.

Les pentoses, à l'exception du xylose, sont mal tolérés. Le xylose permet à quelques gonades de survivre 3 à 5 jours, mais il ne favorise ni différenciation ni croissance. Dans certains cas, il exerce une action inhibitrice sur la différenciation du cortex des gonades femelles. Cet effet s'observe également dans le cas du ribose et de l'arabinose (tableau XV). La structure de ces organes dépourvus de cortex rappelle celle d'une gonade droite femelle. Elle est réduite à une médullaire formée de cordons tantôt serrés, tantôt lâches et vacuolaires; elle est entourée par un épithélium aplati (fig. 37).

L'augmentation ou l'abaissement de la concentration d'un pentose dans le milieu se révèle inefficace.

FIG. 37.

Détail d'une gonade gauche femelle d'embryon de Canard, prélevée à 8 jours d'incubation, cultivée sur le milieu 50 dont le glucose a été remplacé par du xylose. Noter l'absence de différenciation du cortex. La gonade, réduite à une médullaire formée de cordons indifférenciés, est entourée par un épithélium peu épais.



m. i., médullaire indifférenciée; *e.*, épithélium de la gonade. (Gr. : $\times 355$.)

c. — CONCLUSION

Le glucose joue un rôle considérable dans la nutrition des gonades cultivées en milieu synthétique. Sa présence est indispensable dans un milieu constitué exclusivement de sels minéraux et d'acides aminés.

Des essais de remplacement du glucose par d'autres glucides montrent que les hexoses : mannose, fructose ou galactose sont favorables à la survie de la plupart des explants des deux sexes. Il en est de même d'un diholoside, le saccharose. Cependant, seul le mannose peut suppléer efficacement le glucose au point de vue de la différenciation sexuelle des gonades femelles. La différenciation sexuelle des gonades mâles s'effectue plus difficilement en présence de mannose, de fructose et surtout de galactose. Elle ne se réalise jamais en présence de diholosides et de pentoses.

Le fructose, le saccharose et le xylose exercent une action inhibitrice sur la croissance des gonades.

On remarquera que les résultats obtenus avec les hydrates de carbone sont comparables à ceux que l'on obtient avec des solutions d'acides aminés plus ou moins favorables. Les milieux favorables sont toujours propices à la différenciation mâle (ex. milieu C/2). Au contraire, les gonades femelles s'accoutument mieux de milieux appauvris en substances azotées (ex. milieu 26 ou 27). Ainsi, lorsqu'on soustrait le glucose du milieu 50 et qu'on le remplace par du galactose, on abaisse sa valeur en dessous de celle du milieu B/2. Ce milieu ne permet plus qu'à un faible nombre d'explants mâles de se différencier (comparer fig. 36 et fig. 23). De même, le remplacement du glucose par du saccharose réduit la valeur du milieu 50 à celle d'un milieu 27 ou 33 (milieux à un seul acide aminé, cystéine ou méthionine) qui ne permet plus que la différenciation femelle. Ainsi, la différenciation mâle devient presque un critère de la qualité d'un milieu.

VI. — ÉTUDE DES BESOINS EN VITAMINES DES GONADES EMBRYONNAIRES D'OISEAU CULTIVÉES EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Aux chapitres III et IV, nous avons analysé les besoins en acides aminés de la différenciation sexuelle des gonades. Nous avons montré que des mélanges appropriés d'acides aminés (milieu 151 ou C/2) sont capables d'assurer l'autodifférenciation normale des gonades en ovaires ou en testicules, sans toutefois être aussi favorables à la croissance. En effet, les résultats des dosages de l'azote total de gonades cultivées sur le milieu C/2 (voir chapitre III) ont montré que l'augmentation azotée, de 6 % en moyenne, est très faible par rapport à celle que l'on obtient en milieu standard.

Par ailleurs, nous avons montré que des milieux à base d'acides aminés, qui permettent la différenciation des gonades femelles de l'embryon de Canard, ne suffisent pas toujours à la différenciation mâle. Ainsi, le milieu minimum 50, très favorable aux gonades femelles, devient aussi favorable aux gonades mâles lorsqu'on l'additionne de 7 acides aminés (milieu 151, tableau XII). Nous nous proposons l'étude de l'influence des vitamines sur le développement des gonades embryonnaires. Ces substances nous intéressent au double point de vue de la croissance et de la différenciation.

La croissance des gonades cultivées sur le milieu C/2 peut-elle être stimulée par l'addition de vitamines au milieu ?

Ces substances sont-elles capables, au même titre que certains acides aminés, d'améliorer la différenciation des gonades ♂ de l'embryon de Canard cultivées sur le milieu minimum 50 ?

A. — INFLUENCE DES VITAMINES
SUR LA CROISSANCE DES GONADES EXPLANTÉES SUR LE MILIEU C/2

Nous avons eu recours à la méthode du dosage de l'azote total. Nous savons que l'on peut parler de croissance, lorsque le bilan azoté reste positif, compte tenu de l'écart de 10 % qui correspond à l'écart maximum entre deux lots d'organes controlatéraux, au départ (chapitre II).

Nous avons étudié la croissance de testicules prélevés après la différenciation sexuelle. Nous avons déjà constaté que les gonades, prélevées avant la différenciation sexuelle et cultivées en milieux synthétiques, ne s'accroissent pas, alors que prélevées après cette date, elles sont susceptibles d'effectuer une certaine croissance.

Nous nous proposons de préciser, parmi 12 vitamines hydrosolubles et 2 vitamines liposolubles, celles qui ont une action stimulatrice sur la croissance. Des expériences préliminaires ont consisté à rechercher la concentration favorable de chaque vitamine, en se basant sur le critère de l'aspect morphologique des gonades de Poulet de 7 1/2 à 9 jours d'incubation, cultivées pendant 5 jours. Seules figurent au tableau XVI les concentrations optimums retenues pour l'épreuve du dosage. La croissance testée correspond à celle des 2 ou 3 premiers jours de culture, où elle atteint son maximum.

1° Vitamines hydrosolubles.

L'addition au milieu C/2 d'une vitamine, à l'état isolé, ne stimule pas la croissance des gonades cultivées sur le milieu C/2, à l'exception de l'acide folique (tableau XVI). Bien que la croissance des gonades cultivées en présence d'acide folique est significative par rapport à celle des témoins cultivés sur le milieu C/2, nous acceptons ce résultat sous certaines réserves : dans deux séries expérimentales sur quatre, le milieu C/2 était nettement inférieur au milieu C/2 additionné d'acide folique, ce qui a considérablement augmenté l'écart entre ces deux milieux. La vitamine B₁₂ exerce une action défavorable.

Un mélange de 10 vitamines (mélange V₂), qui contient les composants suivants : acide folique, amide de l'acide nicotinique, adermine, méso-inositol, pantothénate de Ca, biotine, aneurine, acide ascorbique, riboflavine, acide para-aminobenzoïque, stimule nettement la croissance des gonades.

Ces résultats corroborent ceux que nous avons observés au point de vue morphologique : une certaine tendance à la nécrose des organes dans le cas de la vitamine B₁₂, une augmentation sensible du volume des organes dans le cas du mélange V₂.

TABLEAU XVI
INFLUENCE DES VITAMINES HYDROSOLUBLES
SUR LA CROISSANCE DE TESTICULES D'EMBRYONS DE POULET DE 9-11 JOURS D'INCUBATION

Vitamine éprouvée	Concentration en γ pour 100 cm ³ de liquide de Tyrode	Milieu C/2 additionné de la vitamine à éprouver				Milieu C/2 témoin des séries expérimentales				Influence de la vitamine sur la croissance azotée		
		Nombre de doses	Nombre de gonades par lot	Teneur moyenne en γ par gonade		Variation moyenne de l'N total en %	Nombre de dosages	Nombre de gonades par lot	Teneur moyenne en γ par gonade		Variation moyenne de l'N total en %	
				Au départ	Après culture				Au départ			Après culture
Ac. ascorbique	0,02	4	6	4,1	4,5	+10	4	6	4,4	5	+14	+
Ac. folique	0,002	4	6	4,6	5,3	+15	4	6	5	4,9	-2	+
Ac. para-aminobenzoïque	0,02	5	6	4,8	5,1	+6	4	6	4,9	5,2	-8	+
Amide de l'ac. nicotinique	0,002	5	6	4,2	4,5	+7	4	6	4,1	4	-2	+
Adermine	0,02	4	6	4,8	5,4	+12	5	6	4,9	5	+2	+
Biotine	0,02	7	6	5	5,1	0	5	6	4,9	5,2	+6	+
Aneurine	0,02	5	6	5,1	5,6	+10	3	6-8	4,6	5,3	+16	+
Méso-inositol	0,002	7	6	4,3	4,7	+9	8	6	4,1	4,4	+7	+
Pantothénate de Ca	0,02	5	6-8	4,4	5,1	+16	5	6-8	4,5	4,9	+9	+
Riboflavine	0,02	5	6-8	4,9	5,4	+10	5	6-8	4,6	5,3	+15	+
Vitamine B12	0,002	7	6	4,3	3,8	-11	6	6	4,7	4,7	0	+
Mélange V ₂ (1)		6	6	5,6	7	+25	5	6	5,5	5,7	+4	+

(1) Les concentrations des vitamines qui figurent dans le mélange V₂ sont celles des vitamines éprouvées individuellement.
* 0,01 < P < 0,05.
** P < 0,01.

(1) Les concentrations des vitamines qui figurent dans le mélange V₂ sont celles des vitamines éprouvées individuellement.

* 0,01 < P < 0,05.

** P < 0,01.

2° Vitamines liposolubles.

L'action des vitamines liposolubles A et D sur la croissance des gonades n'a pas été étudiée à l'aide de l'ultraméthode de Kjeldahl. Ces vitamines se révèlent défavorables à la survie des gonades. Il est nécessaire d'abaisser considérablement leur concentration dans le milieu pour diminuer certaines propriétés toxiques qu'elles présentent. On réussit à diminuer la toxicité de ces substances en abaissant la concentration de la vitamine A à 0,000.6 U. I., celle de la vitamine D à 0,000.8 U. I. pour 100 cm³ de solution synthétique. La survie des gonades reste cependant moins bonne qu'en milieu C/2 non additionné de vitamine.

B. — INFLUENCE DE L'ACIDE FOLIQUE ET DU MÉLANGE V₂
SUR LA DIFFÉRENCIATION DES GONADES MALES DE L'EMBRYON DE CANARD
EXPLANTÉES SUR LE MILIEU 50

Les gonades ont été prélevées à 8 1/4 jours d'incubation. A ce stade, le sexe des gonades de l'embryon de Canard devient prévisible d'après des critères morphologiques: asymétrie des gonades ♀, symétrie des testicules. Au point de vue histologique les cordons médullaires d'une gonade présumée ♂ montrent déjà une certaine tendance à se différencier en cordons testiculaires. Les gonades droites ont tantôt été fixées au départ de la culture, tantôt elles ont été cultivées en milieu standard. La durée de l'explantation a été prolongée jusqu'à 8 jours.

Les résultats montrent que l'acide folique et le mélange V₂ influencent peu la différenciation des gonades mâles cultivées sur le milieu 50. L'étude histologique révèle dans tous les cas deux catégories de structures: des testicules typiques, dont l'aspect est peu différent des gonades droites témoins cultivées en milieu standard et des testicules peu évolués, caractérisés par la présence de cordons encore insuffisamment élargis. La proportion de ces derniers est légèrement plus importante sur le milieu 50 que sur le milieu 50 additionné du mélange V₂ (tableau XVII). Chez tous les explants, l'épithélium germinatif a disparu. Ce fait n'est pas surprenant étant donné le stade tardif auquel a été fait le prélèvement et la durée de culture de 7 à 8 jours.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé la solution 199 de PARKER (1950). Cette solution, qui contient, en plus des acides aminés du milieu C/2, des vitamines et des composants des acides nucléiques, ne s'est pas révélée plus favorable à la différenciation des gonades mâles que la solution C/2 (tableau XVII). Ces résultats rejoignent ceux que nous obtenons avec la solution 50 additionnée de vitamines. Ils tendent à prouver que ces substances ne jouent pas un rôle très important dans la différenciation sexuelle des gonades explantées en milieux synthétiques.

TABLEAU XVII

INFLUENCE DE CERTAINS MILIEUX VITAMINÉS
SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD

Milieu étudié (1)	Stade du prélèvement en jours	Durée de culture en jours	Nombre total d'ex-plants gauches	Différenciation sexuelle des gonades gauches					
				Mâles				Femelles	
				Testicules	Testicules avec é. g. (2)	Testicules peu évolués	Structures indifférenciées	Ovaires	
								Structure histologique	Non débités en coupes
50 + Af	8 1/4	7-8	21	7	—	5	—	7	2
50 + V ₂	8 1/4	7-8	24	8	—	3	1	5	7
50	8 1/4	7-8	18	7	—	6	—	2	3
199 de Parker.	7 1/2	8	12	3	1	—	—	4	4
C/2	7 1/2	8	11	5	1	—	—	2	3

(1) Les concentrations des vitamines du mélange V₂ et la concentration de l'acide folique sont celles qui figurent au tableau XVI.
(2) é. g., épithélium germinatif.

C. — CONCLUSION

On peut distinguer, dans les besoins nutritifs des gonades embryonnaires d'Oiseau cultivées *in vitro*, ceux de la différenciation et ceux de la croissance. La différenciation et la croissance ne paraissent pas contemporaines chez les gonades cultivées *in vitro*; elles constituent deux étapes que les explants franchissent successivement. La différenciation non accompagnée de croissance est particulièrement nette en milieux synthétiques. On peut aisément imaginer que l'explant utilise d'abord toute l'énergie qu'il puise dans le milieu ou qu'il garde en réserve pour sa différenciation. Ce n'est que lorsqu'il a franchi cette étape qu'il est susceptible d'utiliser les substances nutritives qu'on lui présente au profit de la croissance.

Toujours est-il que les besoins de la croissance sont plus élevés que ceux de la différenciation. Un milieu défini peut suffire à la réalisation de l'un des deux processus, non de l'autre. Ainsi, les gonades embryonnaires, prélevées à l'état de jeunes ébauches, sont capables de se différencier sur un milieu constitué de 12 acides aminés favorables (milieu 151), tandis que les gonades, prélevées à un stade où leur différenciation est fortement amorcée, ne s'accroissent que peu sur un milieu, même com-

plexe, comme le milieu C/2. La présence de substances telles que des vitamines s'avère nécessaire. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un mélange de 10 vitamines hydrosolubles. L'augmentation de la teneur en azote total est, en moyenne, de 21 % par rapport au milieu C/2. Toutefois, la croissance en milieu synthétique vitaminé reste nettement inférieure à celle que l'on obtient en milieu naturel.

VII. — ÉTUDE DE L'ACTION
DES HORMONES SEXUELLES CRISTALLISÉES
SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE
DES GONADES DE L'EMBRYON DE CANARD
CULTIVÉES EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Nous avons obtenu, en collaboration avec ET. WOLFF (1952 d), l'intersexualité des gonades gauches d'embryons de Canard mâles, cultivées *in vitro*, par deux procédés expérimentaux : l'association d'une gonade mâle et gonade femelle et le contact direct entre une gonade mâle et une solution d'hormone femelle cristallisée. Ces expériences ont été effectuées en milieu standard à base d'extrait d'embryons de 7 jours.

L'association de gonades hétérosexuées, prélevées avant le stade de la différenciation sexuelle, détermine chez le partenaire mâle une forte féminisation qui se manifeste sur les deux constituants de la gonade. Cette action se traduit par une inhibition de la différenciation testiculaire de la médulla et une prolifération corticale de l'épithélium germinatif.

Les expériences, dans lesquelles les gonades explantées ont été soumises au contact direct d'une solution d'hormone femelle cristallisée (benzoate d'œstradiol) ont donné les mêmes résultats que l'association de couples parabiotiques. Elles nous ont permis de conclure à l'action directe des hormones sexuelles sans l'interposition d'aucun médiateur hormonal ou nerveux.

Au cours des chapitres précédents, nous avons vu que les gonades génétiquement ♂ d'embryons de Canard ne se différencient pas toujours en testicules caractéristiques. Lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu, qui ne contient qu'un seul acide aminé, la cystéine (milieu 27), elles ne se différencient pas. Sur d'autres milieux plus complexes (milieux B/2, C/2, 46, 50), elles acquièrent, dans certains cas, une structure intermédiaire qui mime l'intersexualité. Ces observations nous ont incités à étudier l'action des hormones sexuelles sur les gonades cultivées en différents milieux synthétiques. Nous nous sommes demandé si l'addition d'une hormone femelle à un milieu de culture peu favorable à la différenciation normale a pour conséquence l'orientation de la différenciation dans une direction opposée à la normale. En d'autres termes, les gonades généti-

quement mâles, soumises à son action, subissent-elles la différenciation femelle ?

Au contraire, l'addition au milieu de culture d'une hormone mâle exerce-t-elle une action favorable sur l'évolution normale des testicules, en rétablissant un éventuel déséquilibre hormonal entraîné par les conditions d'explantation en milieu synthétique ou bien en agissant directement sur le métabolisme azoté ? Des études récentes ont montré que la testostérone pouvait continuer son action anabolisante dans le métabolisme protéique à toutes les époques de l'existence de l'individu et favoriser la rétention azotée (E. TERROINE, 1952 : La synthèse protéique). Il semblerait donc parfaitement possible que les hormones sexuelles agissent en culture pour permettre la synthèse protéique. En définitive, de telles expériences nous permettront peut-être de préciser le rôle que jouent, dans la différenciation sexuelle des gonades, les facteurs nutritifs et les facteurs hormonaux.

A. — ACTION DES HORMONES FEMELLES

1° Action de 3 hormones femelles sur la différenciation sexuelle des gonades cultivées en milieu synthétique 27.

Les gonades embryonnaires de Canard sont prélevées au 8^e jour de l'incubation. Dans toutes les séries expérimentales, les gonades gauches seules sont soumises à l'action de l'hormone, les gonades droites correspondantes évoluent séparément en milieu standard. Elles révèlent ou confirment le sexe des gonades gauches. La durée de culture est de 5 à 6 jours.

a) *Action du benzoate d'œstradiol.* — Nous utilisons le benzoate d'œstradiol en solution huileuse à la concentration de 5 mg par centimètre cube.

16 gonades gauches sont cultivées sur le milieu synthétique 27 qui renferme de la cystéine comme unique source azotée. Selon la technique habituelle, on amène, au moment de l'explantation, plusieurs gouttelettes d'hormone au contact direct de la gonade.

Après quelques jours de culture, on reconnaît les ovaires à la petite frange transparente qui entoure cette catégorie d'explants. Mais il est curieux de constater que, chez les gonades mâles, on n'assiste pas aux transformations remarquables que nous avons observées chez les testicules cultivés en milieu standard et soumis à l'action de cette même hormone. En effet, on ne voit pas, aux points de contact avec les gouttelettes d'hormone, la surface de l'organe se hérissier de petits lobes crénelés ou

d'expansions débordantes qui attestaient l'action stimulatrice de l'hormone sur le cortex de la gonade. Les explants conservent sur ce milieu leur aspect de bandelettes plus ou moins aplaties qu'ils présentaient au moment du prélèvement.

L'investigation histologique ne révèle aucun signe d'intersexualité chez ces gonades. Elles présentent, après 5 jours de culture, une structure analogue à celle des gonades cultivées en l'absence d'hormone. Tantôt les explants sont entourés par un épithélium aplati, tantôt ils sont localement dépourvus d'une membrane limitante. A ces endroits, les cellules ont tendance à migrer hors de l'organe et lui confèrent un aspect éraillé, comme on l'observe parfois chez les gonades cultivées en l'absence d'hormone. La médullaire est constituée de cordons indifférenciés. Dans 4 cas sur 9, on observe quelques plages de nécrose qui envahissent l'organe.

Les gonades femelles ont l'aspect d'ovaires caractéristiques dans 3 cas sur 7. Chez 4 explants, un cortex peu épais et stérile recouvre une médullaire partiellement nécrosée. Il est possible que l'étalement partiel de certaines gouttelettes d'huile sur les fragiles ébauches, déjà placées dans des conditions de nutrition précaires, soit, du moins en partie, responsable de ces phénomènes de nécrose.

b) *Action du dipropionate d'œstradiol.* — Nous utilisons cette hormone en suspension dans le milieu à la concentration de 0,5 mg par centimètre cube de solution synthétique. Le milieu de culture se présente sous la forme d'un gel transparent criblé d'innombrables cristaux d'hormone dont certains sont amenés au contact direct des explants. Ce milieu s'est révélé plus favorable à la survie des gonades que le milieu précédent. Après 5 jours de culture, les gonades femelles (5 cas sur 6) sont constituées de tissus parfaitement sains et différenciées en ovaires caractéristiques. Les gonades mâles ont l'aspect de petites languettes translucides, légèrement renflées, mais aucun signe de transformation n'est visible à la surface de l'organe. L'histologie montre que les cordons médullaires ne se différencient pas en cordons testiculaires, mais l'épithélium germinatif persiste sur tout le pourtour de la gonade (9 cas sur 11). Il est constitué de 2 ou 3 assises de cellules cubiques, mais il ne contient que rarement des cellules germinales ou des mitoses (fig. 38). Il semble que l'on puisse attribuer à l'action de l'hormone le maintien de l'épithélium germinatif. Par contre, elle ne peut être rendue responsable de l'arrêt de la différenciation de la médulla, car celle-ci ne se développe qu'exceptionnellement sur ce milieu en l'absence d'hormone.

c) *Action du sel de Na de l'acide n-bis-déhydrodoisynolique.* — Cette hormone, en solution aqueuse, manifeste certaines propriétés toxiques, comme nous l'avions déjà constaté dans le cas de cultures en milieu standard. Incorporée au milieu 27 à une dose même très faible, de l'ordre

de 0,3 mg par centimètre cube, elle provoque encore une dissociation intense des cellules à la surface des explants des deux sexes. La masse centrale des organes se trouve ainsi considérablement réduite. L'histologie révèle une nécrose importante des tissus.

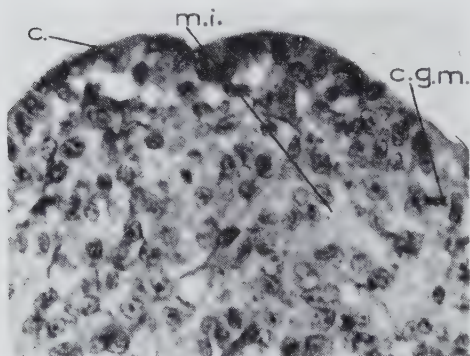


FIG. 38.

Détail d'une gonade gauche d'embryon de Canard, prélevée au 8^e jour de l'incubation, cultivée sur le milieu 27 et soumise à l'action d'une hormone ♀ cristallisée : le dipropionate d'œstradiol. Médullaire indifférenciée. Développement d'un cortex peu épais contenant une cellule germinale en mitose.

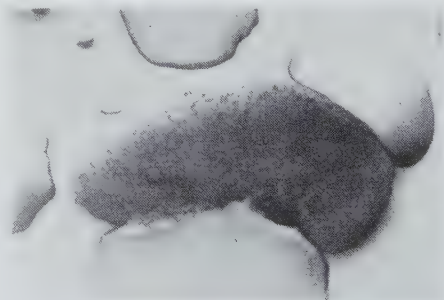
c., cortex; m. i., médullaire indifférenciée; c. g. m., cellule germinale en mitose. (Gr. : $\times 465$.)

*2° Action du benzoate d'œstradiol en solution huileuse
sur la différenciation sexuelle des gonades
cultivées en milieu synthétique C/2.*

Les expériences précédentes, sur l'obtention de l'intersexualité expérimentale des gonades mâles cultivées en milieu synthétique 27, n'ont pas

FIG. 39.

Gonade gauche d'embryon de Canard mâle, cultivée sur le milieu C/2, au contact de gouttelettes d'une solution huileuse de benzoate d'œstradiol. Noter l'apparition d'une frange transparente sur l'un des bords latéraux de l'organe. (Gr. : $\times 35$.)



abouti à des résultats positifs. En effet, aucune gonade mâle cultivée sur ce milieu n'a été franchement féminisée par l'hormone. Cet échec nous paraissait surprenant, étant donné les proportions très élevées d'intersexués que nous avons obtenues chez les gonades cultivées en milieu standard et soumises à l'influence du benzoate d'œstradiol. La compo-

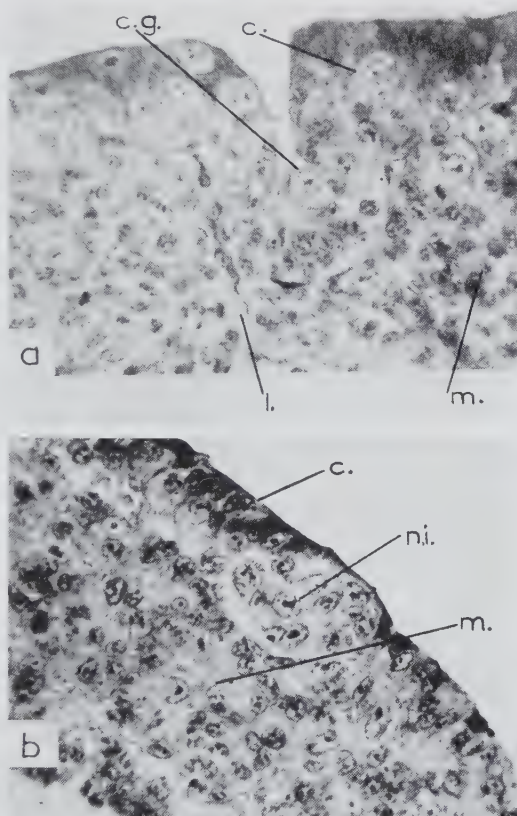
sition même du milieu synthétique en est-elle responsable ? L'influence de l'hormone femelle ne s'exerce-t-elle que lorsque des conditions favorables à l'autodifférenciation normale sont réalisées ? L'emploi du milieu synthétique C/2 nous permettra peut-être de résoudre cette question.

46 gonades gauches d'embryons de Canard, prélevées au 8^e jour de l'incubation, sont cultivées sur le milieu C/2 au contact direct de goutte-

FIG. 40.

Détail de deux gonades ♂ féminisées par une hormone ♀ cristallisée, incorporée au milieu C/2 (benzoate d'œstradiol en solution huileuse). Un cortex épais et fertile s'enfonce dans la médullaire où l'on observe la formation de lacunes analogues à celles que l'on rencontre chez un ovaire (a). La figure b montre un nid à ovogonies inséré entre les cellules du cortex. La médullaire est constituée de cordons indifférenciés, non testiculaires.

c., cortex; n. i., nid à ovogonies; m., médullaire; c. g., cellules germinales; l., lacunes. (Gr. : $\times 455$.)



lettes de benzoate d'œstradiol en solution huileuse (concentration : 5 mg par cm³). Les gonades gauches femelles se différencient en ovaires (22 cas). Chez de nombreuses gonades de sexe mâle, on assiste à l'apparition de très fines dentelures à la surface de l'organe; les bords latéraux ont tendance à s'aplatir sur le milieu. Chez certains explants, une frange transparente, très mince et irrégulière, s'organise (fig. 39). L'aspect morphologique de ces gonades annonce déjà des transformations de structure. L'examen des coupes histologiques confirme ces observations.

Sur 24 explants génétiquement mâles, dont le sexe est confirmé par les

gonades droites, 10 présentent une structure intersexuée très nette, analogue à celle que nous avons observée en milieu standard sous l'influence du benzoate d'œstradiol. Ils sont recouverts d'un épithélium germinatif très épais, constitué de cellules prismatiques à noyaux orientés perpendiculairement à la membrane basale. Des cellules germinales sont intercalées entre les cellules épithéliales. Des proliférations corticales, localisées sous forme de nids à ovogonies, s'enfoncent dans la médullaire (fig. 40). Elles contiennent des cellules germinales. La médullaire, tantôt massive, tantôt plus réduite, est formée de cordons pleins de nature épithéliale, non testiculaire. La lumière centrale ne se forme pas. On voit se former, dans quelques cas, des lacunes analogues à celles que l'on

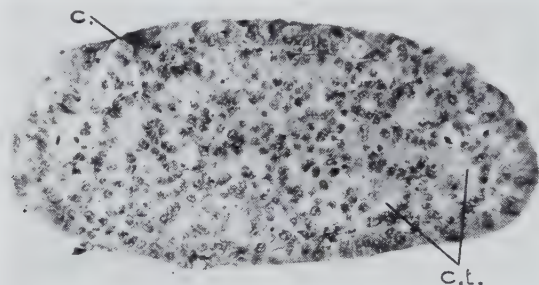


FIG. 41. — Coupe transversale à travers une gonade mâle faiblement féminisée par l'hormone. Différenciation testiculaire de la médullaire. Le cortex, qui entoure presque complètement la gonade, est particulièrement épais sur les bords latéraux de l'organe.

c. t., cordons testiculaires; c., cortex. (Gr. : $\times 235$.)

rencontre chez un ovaire normal. Telle est la structure d'une gonade fortement intersexuée. Chez les gonades faiblement intersexuées (6 cas), les cordons médullaires ont tendance à se différencier en cordons testiculaires par écartement des cellules, mais l'épithélium germinatif conserve une épaisseur notable (fig. 41).

Il convient de remarquer que, chez 8 explants, l'épithélium germinatif n'a pas été stimulé au contact de l'hormone. Chez 4 d'entre eux, la différenciation de la médullaire s'est effectuée normalement en testicule. Chez 4 autres, la médullaire n'a pas évolué. Elle a conservé une structure analogue à celle de la gonade au moment du prélèvement.

Cependant, la proportion élevée des réussites dans cette série expérimentale permet de répondre affirmativement à la question posée : les gonades génétiquement mâles subissent, en milieu synthétique, l'action féminisante de l'hormone femelle, lorsqu'on les place dans des conditions de nutrition favorables à leur développement normal.

3° Action du benzoate d'œstradiol
sur la différenciation sexuelle
des gonades cultivées
en milieux synthétiques B/2, 46 et 50.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de l'hormone femelle sur la différenciation des gonades cultivées en milieux synthétiques dont on fait varier la teneur en acides aminés. Nous avons fixé notre choix sur les milieux B/2, 46 et 50 (voir la composition de ces milieux aux chapitres I et IV). Sans addition d'hormone, ces milieux se révèlent plus ou moins favorables à la différenciation des gonades mâles (voir chapitre IV, fig. 25). La proportion des organes féminisés et l'intensité de la réaction varient avec les milieux nutritifs (tableau XVIII). Il est intéressant de constater que la réponse à l'hormone est d'autant plus importante que le milieu nutritif est plus favorable à la différenciation normale des gonades mâles (milieu 50 $\geq$ milieu 46 $>$ milieu B/2). Chez les gonades fortement ou faiblement intersexuées, l'épithélium germinatif est stimulé. Il émet, de place en place, des proliférations corticales vers la médullaire. Ces deux catégories de gonades diffèrent entre elles par la structure de la médullaire qui est manifestement plus inhibée chez la première que chez la seconde. Dans les deux cas, les gonades conservent des caractères qui les distinguent d'un ovaire.

On remarquera qu'un certain nombre de gonades explantées au contact de l'hormone, sur les milieux 46 et B/2, conservent des structures médullaires indifférenciées et un épithé-

TABLEAU XVIII. — ACTION DU BENZOATE D'ŒSTRADIOL EN SOLUTION HUILEUSE SUR LA DIFFÉRENCIATION DES GONADES GAUCHES DE L'EMBRYON DE CANARD PRÉLEVÉES AU 8^e JOUR DE L'INCUBATION

Milieu de base	Nombre total d'explants	Nombre de gonades droites mâles	Aspect histologique des gonades gauches mâles après 5 à 6 jours de culture					Nombre de gonades droites femelles	Aspect histologique des gonades gauches femelles après 5 à 6 jours de culture					Nombre de gonades droites indifférenciées	Aspect indifférencie des gonades gauches
			Intersexués		Structures indifférenciées avec é. g. — épais	Testicules typiques	Nécroses		Ovaires	Ovaires peu différenciés	Strangulures indifférenciées	Nécroses			
			Fort	Faibles											
B/2	35	16	3	4	6	3	—	19	16	3	—	—	—	—	
46	47	23	5	5	4	8	1	21	15	3	2	1	3	3	
50	29	14	5	4	—	5	—	14	13	1	—	—	1	1	

lium germinatif plus ou moins épais, comme nous les observons chez les gonades cultivées sur ces milieux en l'absence d'hormone. Dans ce cas, comme dans celui des gonades faiblement intersexuées, il est difficile de distinguer l'effet du milieu nutritif de l'effet de l'hormone femelle. Nous avons, à plusieurs reprises, comparé la réaction d'une gonade mâle à un milieu médiocrement propice à l'action d'une hormone femelle ajoutée à un milieu favorable. En effet, l'analogie des caractères structuraux est frappante. S'il est permis d'imaginer que l'hormone femelle agit sur le choix et l'assimilation des aliments du milieu, son action se manifeste

TABLEAU XIX

ACTION DU BENZOATE D'ŒSTRADIOL EN SOLUTION HUILEUSE
SUR LA DIFFÉRENCIATION DES GONADES GAUCHES DE L'EMBRYON DE CANARD
PRÉLEVÉES AU 9^e JOUR DE L'INCUBATION

Milieu de base	Nombre total d'explants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles après 5 jours de culture				Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles après 5 jours de culture
			Testicules	Intersexués	Structures peu différenciées, c. g. $\pm$ épais	Nécrose		Ovaires
46	10	6	3	—	2	1	4	4
C/2	9	4	4	—	—	—	5	5

dans le cas d'un milieu très favorable. Dans le cas d'un milieu moins favorable, le développement des gonades est plus ou moins inhibé et, de ce fait, l'action de l'hormone est nulle ou, si elle existe, n'est pas décelable.

Notons enfin que certaines gonades, explantées sur l'un ou l'autre des 3 milieux, ont évolué en testicules malgré la présence de l'hormone. L'épithélium germinatif a disparu. Il est remplacé par un épithélium de bordure, très aplati. Les cordons testiculaires présentent une structure très différenciée. Il est probable qu'au moment du prélèvement ces explants n'étaient plus dans la période d'indifférence sexuelle malgré la durée d'incubation et que l'hormone, qui aurait dû agir pendant cette période, n'est plus capable, à ce stade du développement, d'orienter la différenciation dans une direction anormale.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes proposé de soumettre quelques gonades, prélevées au 9^e jour de l'incubation, à l'action de l'hormone.

Nous observons la différenciation testiculaire de tous les explants cul-

tivés en milieu C/2 (tableau XIX). Elle s'effectue, dans la moitié des cas seulement, chez les explants cultivés en milieu 46. Deux gonades présentent une structure voisine de la configuration de la gonade au moment du prélèvement.

B. — ACTION DES HORMONES MALES

Des gonades gauches d'embryons de Canard, prélevées au 8^e jour de l'incubation, sont cultivées sur les 3 milieux synthétiques suivants : milieux 27, 46 et C/2. Elles sont soumises à l'action du propionate de

TABLEAU XX

INFLUENCE DU PROPIONATE DE TESTOSTÉRONE EN SOLUTION HUILEUSE
SUR LA DIFFÉRENCIATION DES GONADES GAUCHES DE L'EMBRYON DE CANARD
PRÉLEVÉES AU 8^e JOUR DE L'INCUBATION

Milieu de base	Nb. total d'ex-plants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles après 5 jours de culture					Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles après 5 jours de culture		
			Testicules		Structures indifférenciées		Nécroses		Ovaires	Structures indifférenciées	Nécroses
							avec é. g.			avec é. g.	
27	12	5	—	—	3	1	1	7	1	2	4
46	14	4	2	1	—	1	—	10	6	3	1
C 2	16	6	2	4	—	—	—	10	8	—	2

testostérone incorporé au milieu en solution huileuse ou en suspension aqueuse. La concentration de l'hormone varie de 0,5 mg à 5 mg par cm³, selon le solvant utilisé (solution d'acides aminés ou huile d'olive neutre).

1^o Action du propionate de testostérone en solution huileuse.

Selon la méthode habituelle, on amène plusieurs gouttelettes d'hormone en solution huileuse au contact direct de la gonade que l'on cultive pendant 5 à 6 jours. Les gonades droites correspondantes sont cultivées en milieu standard sans hormone.

Explantées sur les milieux C/2 et 46, les gonades femelles évoluent, au contact de l'hormone ♂, en ovaires caractéristiques. Cependant, on constate que les gonades, explantées dans les mêmes conditions sur le milieu 27, survivent et se différencient mal. Le développement des gonades mâles s'effectue comme en l'absence d'hormone. Sur les milieux 46 et C/2, les explants acquièrent la forme de boyaux cylindriques caractéristiques, tandis que sur le milieu 27 ils restent grêles et plats.

TABLEAU XVI. — INFLUENCE DU PROPIONATE DE TESTOSTÉRONE EN SUSPENSION DANS LE MILIEU SUR LA DIFFÉRENCIATION DES GONADES GAUCHES DE L'EMBRYON DE CANARD PRÉLEVÉES AU 8^e JOUR DE L'INCUBATION

Milieu de base	Nombre total d'explants	Nombre de gonades droites mâles	Différenciation des gonades gauches mâles après 5 jours de culture					Nombre de gonades droites femelles	Différenciation des gonades gauches femelles après 5 jours de culture		Nombre de gonades droites perdues	Gonades gauches nécrosées
			Testicules	Structures indifférenciées		Nécroses	Ovaires		Nécroses			
				- é. g.	+ é. g.							
27	8	2	—	1	1	—	3	3	—	2		
46	8	5	—	3	—	2	1	—	2	—		

L'investigation histologique (tableau XX) montre que la structure de la plupart des gonades femelles cultivées sur les milieux C/2 et 46 est une structure d'ovaire. Le cortex est normal, souvent fertile. La médullaire, encore peu régressée chez certains explants, présente la structure habituelle : elle est constituée de cordons serrés, indifférenciés qui contiennent des cellules germinales. Les gonades femelles, cultivées sur le milieu 27, sont indifférenciées ou nécrosées. L'une et l'autre de ces formations sont-elles imputables à l'action de l'hormone mâle ou aux conditions expérimentales peu propices au développement de très jeunes ébauches ? On se rappellera que les gonades femelles, cultivées sur ce même milieu au contact de gouttelettes huileuses d'hormone femelle, présentaient également des phénomènes de nécrose au niveau de la médullaire.

La structure histologique des gonades mâles, cultivées sur les milieux C/2 et 46 au contact de gouttelettes d'hormone, est très souvent une structure mâle typique. Cependant, il est remarquable de constater que des lambeaux d'épithélium germinatif persistent chez certains explants et que toutes les gonades restent indifférenciées sur le milieu 27.

Le développement s'effectue, par conséquent, comme en l'absence d'hormone.

2° Action du propionate de testostérone en suspension dans le milieu.

Le propionate de testostérone est incorporé aux solutions d'acides aminés 27 et 46 selon la technique décrite au chapitre I.

Les résultats sont sensiblement les mêmes que ceux que l'on obtient sous l'influence de l'hormone en solution huileuse (tableau XXI).

La différenciation des gonades mâles n'est pas stimulée par l'hormone. Les explants sont restés dans un état proche de celui qu'ils présentaient au moment du prélèvement.

En définitive, le propionate de testostérone ne favorise pas la différenciation testiculaire des explants cultivés en milieu 27. Il ne fait pas non plus régresser les lambeaux d'épithélium germinatif qui persistent chez certains explants cultivés sur les milieux 46 et C/2 et, surtout, il ne masculinise pas les gonades femelles, ce qui est conforme aux résultats antérieurs d'ET. WOLFF (1935 a).

La survie et la différenciation des gonades femelles cultivées sur un milieu nutritif favorable (milieux 46 et C/2) ne sont pas inhibées par l'hormone mâle.

C. — CONCLUSION

Influence de l'hormone mâle. — Les gonades indifférenciées de l'embryon de Canard se développent de la même manière sur un milieu synthétique, en la présence ou en l'absence d'une hormone mâle (propionate de testostérone). Lorsque l'hormone est incorporée à un milieu peu nutritif, comme le milieu 27, elle ne favorise pas plus la différenciation testiculaire des explants que le milieu sans hormone. Lorsqu'elle est incorporée à des milieux plus favorables à la différenciation mâle, comme les milieux 46 et C/2, elle ne fait pas disparaître certains lambeaux d'épithélium germinatif. Ceux-ci persistent chez des gonades cultivées pendant 5 jours, bien que la médullaire présente une structure plus ou moins évoluée. Ces résultats tendent à prouver que ce n'est pas uniquement une insuffisance d'hormone mâle qui empêche les gonades d'évoluer normalement, mais que la cause est à rechercher dans les conditions mêmes de l'explantation, voire dans une déficience nutritive. L'hormone mâle ne semble pas non plus agir sur le métabolisme azoté en favorisant l'utilisation des acides aminés du milieu. Les gonades femelles de l'embryon de Canard, explantées en milieux synthétiques, ne sont pas influencées par le propionate de testostérone. Elles se différencient en ovaires reconnaissables macroscopiquement. Leur structure histologique est normale. Ces observations sont en accord avec les résultats antérieurs d'ET. WOLFF (1935-1939) qui montrent que les injections d'hormones mâles à l'embryon d'Oiseau n'ont jamais provoqué la masculinisation des ovaires.

Influence de l'hormone femelle. — Lorsque des gonades mâles d'embryons de Canard sont cultivées sur un milieu peu nutritif (milieu 27), elles ne subissent pas l'influence d'une hormone femelle cristallisée

(benzoate d'œstradiol) à laquelle on les soumet expérimentalement. Elles ne se transforment pas en glandes intersexuées. L'épithélium germinatif se maintient, mais ne prend pas l'allure d'un cortex. La médullaire conserve sa structure indifférenciée habituelle.

L'emploi d'un milieu plus nutritif, par contre, favorise l'action de l'hormone femelle. La féminisation de la gonade est d'autant plus intense que le milieu est plus favorable au développement normal. Les meilleurs résultats en milieux synthétiques ont été obtenus avec le milieu C/2. L'action de l'hormone se traduit par la formation d'un cortex ovarien et par l'inhibition plus ou moins poussée de la différenciation de la médullaire. Ces résultats sont analogues à ceux que nous avons obtenus en collaboration avec Et. WOLFF (1952 *d*), en soumettant des gonades, cultivées en milieu standard, à l'influence d'une hormone femelle. Ils confirment l'interprétation que nous avons donnée sur le mode d'action des hormones sexuelles : les hormones sexuelles exercent directement leur action sur les gonades explantées, sans l'intermédiaire de l'organisme ou d'aucune de ses parties, l'extrait d'embryon, seul ingrédient issu d'un organisme vivant, étant remplacé par une solution synthétique rigoureusement anhormonale.

On sait, d'après les travaux antérieurs d'Et. WOLFF (1935 à 1950) et d'Et. WOLFF et de ses collaborateurs (1935 à 1955), que les hormones jouent un rôle très important dans la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires. Les expériences de culture de gonades en milieux synthétiques purs et en milieux synthétiques additionnés d'hormones sexuelles cristallisées montrent en plus le rôle que jouent les facteurs nutritifs dans la différenciation des gonades. Elles montrent en particulier que, si les hormones font toute la différenciation sexuelle chez l'embryon normal comme chez les explants en culture, des conditions de nutrition favorables sont nécessaires à leur élaboration.

VIII. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les recherches que nous venons d'exposer apportent une contribution au problème de la nutrition des gonades embryonnaires d'Oiseau cultivées *in vitro*.

Les expériences de culture en milieu standard naturel avaient montré que les glandes génitales, en particulier celles de l'embryon de Canard, effectuent leur différenciation sexuelle conformément à leur sexe génétique : l'évolution mâle ou femelle d'une ébauche gonadique, prélevée avant le stade de la différenciation sexuelle, est une autodifférenciation.

L'utilisation de milieux synthétiques a permis de mettre en évidence

que cette autodifférenciation n'est pas liée automatiquement à une survie, même prolongée, des organes, mais qu'elle peut être conditionnée par des facteurs extérieurs à elle : des facteurs nutritifs.

D'autre part, ces recherches ont révélé certaines divergences dans les besoins alimentaires d'une gonade mâle et d'une gonade femelle : les milieux très favorables sont toujours propices à la différenciation mâle, les gonades femelles, au contraire, s'accommodent mieux de milieux appauvris en substances azotées.

Parmi les substances aminées nécessaires au développement des organes, les acides aminés sulfhydrilés jouent un rôle indispensable. L'absence de cystéine dans un milieu est incompatible avec la survie des organes. La cystéine ou la méthionine assure la différenciation des gonades femelles, mais ne permet pas l'évolution testiculaire de la médullaire. D'autres acides aminés se révèlent nécessaires : essentiellement l'arginine, l'histidine et l'acide glutamique, accessoirement l'hydroxyproline, l'ornithine, le glycocolle, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine et la thréonine.

Le glucose constitue un autre facteur d'importance primordiale dans la nutrition des organes explantés. Il ne peut être suppléé par aucun autre hexose, à l'exception du mannose, au moins en ce qui concerne la différenciation des gonades femelles. Certains disaccharides et certains pentoses assurent incomplètement la survie et la différenciation des gonades.

Les expériences de culture de gonades embryonnaires de Canard en milieux synthétiques ont mis en évidence des anomalies de la différenciation sexuelle en rapport avec le milieu nutritif. Les milieux synthétiques déterminent fréquemment une apparente intersexualité des gonades mâles. Ces phénomènes constituent-ils un simple retard du développement ou bien sont-ils l'expression d'une intersexualité d'origine nutritive ? Il semble que l'on puisse, dans certains cas, attribuer à la durée de culture insuffisante la persistance de l'épithélium germinatif, en particulier lorsque les explants, prélevés à un stade très jeune, sont cultivés sur un milieu relativement riche en acides aminés qui n'entrave pas l'évolution normale de la médullaire. Mais cette hypothèse n'explique pas la stimulation de l'épithélium germinatif, accompagnée d'une inhibition du développement de la médullaire, chez certaines gonades prélevées à un stade plus tardif (8 jours d'incubation), cultivées sur un milieu composé de quelques acides aminés. Il est vraisemblable qu'un déséquilibre hormonal des gonades, provoqué par les conditions mêmes de l'explantation, est responsable de ces ambiguïtés de structure. Deux facteurs doivent intervenir dans le développement normal des glandes génitales : les hormones sexuelles et les facteurs nutritifs. C'est ce que tendent à prouver les expériences faisant intervenir des hormones sexuelles cristallisées. L'addition d'une hormone mâle à un milieu de culture déficient ne favorise pas le développement des organes qui, nor-

malement, ne s'effectue pas sur ce milieu. L'absence de différenciation n'est donc pas provoquée uniquement par le manque d'hormone mâle, mais semble due à une insuffisance nutritive.

D'autre part, les hormones sexuelles femelles ne provoquent pas l'intersexualité des gonades mâles cultivées en milieux déficients, alors qu'elles agissent en milieux favorables. Il est donc possible que l'élaboration normale des hormones sexuelles par une gonade embryonnaire ne puisse s'effectuer que lorsque des conditions de nutrition favorables sont réalisées, c'est-à-dire en présence de substances azotées spécifiques.

Les gonades embryonnaires de Poulet présentent des besoins en acides aminés sensiblement voisins de ceux des gonades de l'embryon de Canard. Les acides aminés indispensables, essentiels et favorables sont les mêmes. La seule différence réside dans le fait que des substitutions d'acides aminés favorables sont possibles. Ainsi l'hydroxyproline, l'ornithine, le glycocole, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine et la thréonine peuvent se remplacer l'un l'autre. La différence dans la nature de la différenciation peut être due à une certaine divergence dans les besoins nutritifs des deux espèces d'Oiseau. Contrairement à ce qui se passe chez l'embryon de Canard, c'est la médullaire qui se différencie aisément en testicule et c'est le cortex qui se développe moins bien. La différenciation du cortex des ovotestis constitue le véritable critère de la qualité d'un milieu. La différenciation aberrante de la médullaire, en culture *in vitro*, n'est pas influencée par les facteurs nutritifs. Les facteurs hormonaux n'ont jusqu'à ce jour guère été capables de modifier cette évolution anormale. Seules, certaines interventions ont été fructueuses. B. SALZGEBER (1957) a réussi à ramener un ovotestis à sa structure normale sous l'influence de la trypaflavine qui agit sélectivement sur la médullaire en tant qu'inhibiteur de métabolisme.

Dans toutes nos expériences, nous avons surtout insisté sur la différenciation des caractères somatiques des gonades, non sur celle des éléments germinaux. Nous avons déjà observé, chez les explants cultivés en milieu standard, que certains d'entre eux étaient partiellement ou complètement stériles, que d'autres, par contre, renfermaient un grand nombre de cellules germinales au repos ou en mitose, certaines ayant atteint les premiers stades de préméiose. Les causes qui entraînent la dégénérescence des gonocytes ne sont pas encore élucidées. La destinée des cellules germinales ne semble pas dépendre de la qualité nutritive d'un milieu. Nous pensons plutôt que les conditions de l'explantation sont elles-mêmes en jeu, que les explants s'accommodent mal du passage de la nutrition embryonnaire à la nutrition *in vitro*, ou du passage de la respiration par voie sanguine à la respiration aérienne (ET. WOLFF, K. HAFFEN et EM. WOLFF, 1953).

Un dernier problème, que nous avons abordé, mais qui est loin d'être

résolu, est celui de la croissance des gonades explantées. Nous avons pu mettre en évidence que les besoins de la croissance des gonades sont plus élevés que ceux de la différenciation. La présence simultanée de plusieurs vitamines dans un milieu augmente le bilan azoté. Mais en aucun cas, la croissance n'est aussi bonne qu'en milieu naturel. Pour atteindre et dépasser le taux de croissance obtenu en milieu standard naturel, on pourrait envisager des repiquages successifs — ne nuisant pas à l'intégrité de l'organe — sur des milieux synthétiques de plus en plus complexes. Le but de nos recherches s'est limité aux besoins nutritifs minimums de la différenciation et de la croissance des gonades. L'étude des besoins maximums fera l'objet de recherches ultérieures.

RÉSUMÉ

1. Le problème des besoins spécifiques de la différenciation sexuelle et de la croissance des gonades de l'embryon d'Oiseau, cultivées en milieux synthétiques, se place dans le cadre général de la nutrition des organes embryonnaires explantés *in vitro*.

2. La méthode de culture d'organes en milieux synthétiques est dérivée de la méthode de culture d'organes en milieu standard naturel.

3. Le milieu à base d'extrait d'embryon permet l'autodifférenciation normale des glandes génitales de l'embryon de Canard prélevées à 7 et 8 jours d'incubation. Elles évoluent dans deux directions divergentes, suivant qu'elles donnent naissance à un testicule ou à un ovaire. Les gonades de l'embryon de Poulet se différencient d'une manière typique dans le cas du sexe mâle, d'une manière aberrante, en ovotestis, dans le cas du sexe femelle.

4. Le substratum de base permet une survie de 3 à 4 jours des gonades, à condition que l'on maintienne la teneur en glucose du milieu, mais il ne favorise ni différenciation ni croissance. On améliore les conditions de survie et de différenciation en ajoutant des mélanges d'acides aminés au substratum de base contenant du glucose.

5. Le milieu B/2 (9 acides aminés) permet une survie prolongée et une différenciation plus ou moins poussée des gonades embryonnaires de Poulet.

Les gonades femelles de l'embryon de Canard se différencient en ovaires caractéristiques, mais la culture des gonades mâles s'est révélée plus délicate. Peu de gonades évoluent en testicules caractéristiques. Elles restent indifférenciées dans de nombreux cas, ou elles acquièrent une structure qui évoque celle d'une gonade intersexuée.

6. La valeur nutritive du milieu B/2 est nettement améliorée par l'addition de 12 acides aminés (milieu C/2). La morphogénèse externe et la structure histologique des gonades embryonnaires de Poulet et de Canard sont très voisines de celles que l'on observe en milieu standard.

7. Parmi les 21 acides aminés qui entrent dans la composition du milieu C/2, éprouvés isolément, aucun ne s'est montré favorable à une survie de plus de 48 heures, à l'exception de la cystéine et de la méthionine. L'un ou l'autre de ces deux acides aminés permet une survie des gonades de 5 à 7 jours et la différenciation des gonades femelles. Ajoutés à la cystéine et à la méthionine, les

acides aminés suivants ont permis de constituer un milieu de base « minimum » : arginine, histidine, acide glutamique (milieu 50) ou lysine (milieu 46). Ce milieu assure l'évolution normale de toutes les gonades femelles, celle des gonades mâles dans la moitié des cas. L'efficacité de ce milieu est supérieure à celle du milieu B/2 sur lequel un tiers seulement des gonades évolue en testicules. Les acides aminés sulphydrilés sont les composés que l'on peut qualifier d'indispensables. L'arginine, la lysine, l'histidine et l'acide glutamique sont des composés essentiels.

D'autres acides aminés, sans être indispensables, sont capables d'améliorer la différenciation des gonades cultivées sur le milieu minimum 50. Ce sont : l'ornithine, la thréonine, l'hydroxyproline, le glycocolle, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine. Dans le cas des gonades de Poulet, ces acides aminés peuvent se substituer l'un à l'autre. Il n'en est pas de même chez l'embryon de Canard où il est nécessaire de les ajouter en groupe.

8. Les besoins des gonades en hydrates de carbone ont été étudiés en milieu synthétique. Des gonades explantées sur un milieu qui contient des substances azotées, en l'espèce un mélange d'acides aminés favorables, tels que cystéine, méthionine, arginine, histidine et acide glutamique, mais qui est dépourvu de glucose, se nécrosent totalement en l'espace de 24 heures. Ces résultats démontrent le rôle indispensable du glucose dans la nutrition des gonades cultivées *in vitro*. Des essais de remplacement du glucose par d'autres glucides ont montré qu'aucun autre hexose, disaccharide ou pentose, ne peut suppléer efficacement le glucose aux deux points de vue de la différenciation sexuelle des gonades mâles et femelles. Seul, le mannose s'est révélé aussi favorable que le glucose dans le cas des gonades femelles. La différenciation des gonades mâles s'effectue plus difficilement en présence de mannose, de fructose et surtout de galactose. Parmi les disaccharides, seul le saccharose permet la différenciation des gonades femelles. Les gonades mâles survivent, mais ne se différencient pas. Des résultats analogues ont été obtenus avec un pentose, le xylose.

9. La croissance des gonades explantées a été mesurée par l'augmentation du taux de l'azote total. Ces mesures ont été effectuées sur des testicules d'embryons de Poulet de 7 1/2 à 11 jours d'incubation. En milieu standard, la croissance se traduit par une augmentation moyenne de l'azote total de 51 %, en milieu synthétique C/2, de 6 %. Des vitamines incorporées au milieu C/2 n'ont pas pour effet une augmentation de l'azote total, à l'exception de l'acide folique et d'un mélange de 10 vitamines hydrosolubles. Ces substances n'améliorent pas la différenciation des gonades mâles cultivées sur le milieu minimum 50.

10. Les gonades génétiquement mâles de l'embryon de Canard ont certaines difficultés à se différencier en milieux synthétiques. Lorsqu'on fait agir une hormone ♀ cristallisée sur les gonades cultivées en milieux synthétiques, on constate que la proportion des organes féminisés et l'intensité de la réaction varient avec les différents milieux. La réponse à l'hormone est d'autant plus importante que le milieu nutritif est plus favorable à la différenciation normale des gonades mâles. Les gonades des deux sexes ne sont pas influencées par l'addition d'une hormone mâle, le propionate de testostérone, quel que soit le milieu de culture auquel elle est incorporée.

On sait, d'après les travaux antérieurs d'ET. WOLFF et de ses collaborateurs, que les hormones font toute la différenciation sexuelle dans l'organisme entier comme dans les explants *in vitro*. Si les hormones femelles peuvent induire des phénomènes d'intersexualité, elles ne peuvent agir qu'en présence de substances nutritives permettant la différenciation sexuelle normale. Ceci invite à penser que l'élaboration normale des hormones sexuelles par une gonade embryonnaire ne peut s'effectuer qu'en présence de substances azotées spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

- BERGMANN (M.) et NIEMANN (C.), 1936. — On blood fibrine. A contribution to the problem of protein structure. *J. Biol. Chem.*, **115**, 77-85.
- BETKER (N.) et WORZNIAK (J. J.), 1952. — Sulfhydryl amino acids as proliferating agents in tissue culture. *Tissue Culture Association, Annual Meeting, 1952*.
- CAMERON (G.), 1950. — Tissue culture technique. *Acad. Press Pub. N. Y.*
- EHRENSWÄRD (G.), FISCHER (A.) et STJERNHOLM (R.), 1949. — Protein metabolism of tissue cells *in vitro*. The chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. *Acta Physiol. Scand.*, **18**, 218-228.
- EVANS (V. J.), BRYANT (J. C.), FIORAMONTI (M. C.), MC QUILKIN (W. T.), SANFORD (K. K.) et EARLE (W. K.), 1956. — Studies of nutrient media for tissue cells *in vitro*. I. A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L. cells. *Canc. Research*, **16**, 77-86.
- EVANS (V. J.), BRYANT (J. C.), MC QUILKIN (W. T.), FIORAMONTI (M. C.), SANFORD (K. K.), WESTFALL (B. B.) et EARLE (W. R.), 1956. — Studies of nutrient media for tissue cells *in vitro*. II. On improved protein-free chemically defined medium for long term cultivation of strain L. 929 cells. *Canc. Research*, **16**, 87-94.
- EVANS (V. J.), SHANNON (J. E.), BRYANT (J. C.), WALTZ (H. K.), EARLE (W. R.) et SANFORD (K. K.), 1953. — A quantitative study of the effect of certain chemically defined media on the proliferation *in vitro* of strain L. cells from mouse. *Nat. Cancer Inst.*, **13**, 773-781.
- FIRKET (J.), 1914. — Recherches sur l'organogénèse des glandes sexuelles chez les oiseaux. *Arch. Biol.*, **29**, 201-387.
- 1920. — Recherches sur l'organogénèse des glandes sexuelles chez les oiseaux. *Arch. Biol.*, **30**, 393-516.
- FISCHER (A.), 1941. — Die Bedeutung der Aminosäuren für die Gewebezellen *in vitro*. *Acta Physiol. Scand.*, **2**, 143-188.
- 1946. — Biology of tissue cells. *University Press, Cambridge*.
- 1948. — Amino acid metabolism of tissue cells *in vitro*. *J. Biochem.*, **43**, 491-497.
- GENGHOFF (D. S.), 1951. — The specificity of the sulfur amino acid requirement of *Tetrahymena geleii*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**, 112-120.
- GRAU (C. R.) et ALMQUIST (H. J.), 1943. — The utilization of the sulfur amino acids by the chick. *J. Nutr.*, **26**, 631-640.
- HAFFEN (K.), 1953. — Résultats préliminaires sur le développement des gonades d'embryons de Poulet cultivées en milieux synthétiques. *C. R. Soc. de Biol.*, **147**, 861-864.
- HAFFEN (K.) et WOLFF (EM.), 1953. — Sur les besoins nutritifs des gonades et de la syrinx des embryons d'oiseaux en culture sur milieux synthétiques. *C. R. Acad. des Sci.*, **237**, 754-756.
- HARRIS (M.) et KUTSKY (P. B.), 1953. — Utilization of added sugars by chick heart fibroblasts in dialysed media. *J. cell. comp. Phys.*, **42**, 449-469.
- HEALY (G. M.), FISHER (D. C.) et PARKER (R. C.), 1954. — Nutrition of animal cells in tissue culture. IX. Synthetic medium n° 703. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **32**, 327-337.
- JENSEN (A. B.), 1948. — Animal tissue cells in protein-free media. *Nature G. B.*, **161**, 273.
- KIELER (J.), 1954 a. — The influence of amino acids on mitotic activity in fibroblast cultures. IV. Effect of methionine, cystine, tryptophane and proline. *Acta Path. Microb. Scand.*, **34**, 1-10.
- 1954 b. — The influence of amino acids on mitotic activity in fibroblast cultures. V. Relations among amino acids. *Acta Path. Microb. Scand.*, **34**, 11-18.
- KIENY (M.), 1953. — Sur l'explantation et la croissance du tibia cartilagineux de l'embryon de Poulet en milieux de culture naturels et synthétiques. *C. R. Soc. de Biol.*, **147**, 868-872.
- 1955 a. — Les besoins nutritifs spécifiques des tibias d'embryon de Poulet en culture *in vitro* sur milieux synthétiques. *C. R. Soc. de Biol.*, **149**, 418-421.

- 1955 b. — Action des acides aminés sulphydrilés sur la croissance du tibia cartilagineux cultivé en milieux synthétiques. *C. R. Soc. de Biol.*, **149**, 1482-1485.
- 1958. — Contribution à l'étude des besoins nutritifs des tibias embryonnaires d'Oiseau cultivés en milieux naturels et synthétiques. *Arch. Anat. micr. et Morph. exp.* (à l'impression).
- KIENY (M.), STENGER-HAFFEN (K.) et WOLFF (EM.), 1954. — Généralités sur les besoins nutritifs des cultures d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *C. R. Acad. des Sci.*, **239**, 1426-1427.
- MORGAN (J. F.) et MORTON (H. J.), 1955. — Studies on the sulfur metabolism of tissues cultivated *in vitro*. A critical requirement for l-cystine. *J. Biol. Chem.*, **215**, 539-545.
- MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.), CAMPBELL (M. E.) et GUÉRIN (L. F.), 1956. — The nutrition of animal tissues cultivated *in vitro*. II. A comparison of various synthetic media. *J. Nat. Cancer Inst.*, **16**, 1405-1415.
- MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) et PARKER (R. C.), 1950. — Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 1-8.
- MORTON (J. H.), MORGAN (J. F.) et PARKER (R. C.), 1950. — Nutrition of animal cells in tissue culture. II. Use of tweens in synthetic feeding mixtures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 22-26.
- ROSE (W. C.), 1938. — The nutritive significance of the amino acids. *Physiol. Rev.*, **18**, 109-136.
- SALZGEBER (B.), 1957. — Influence de facteurs tératogènes sur l'évolution de l'appareil sexué de l'embryon de Poulet. *Bull. Biol.* (sous presse).
- SCHEIB-PFLEGER (D.), 1955. — Contribution biochimique à l'étude des processus de différenciation des canaux de Müller chez l'embryon de Poulet. *Bull. Biol.*, **89**, 404-490.
- SPRATT (N. T.), 1949. — Nutritional requirements of the early chick embryo. I. The utilization of carbohydrate substrates. *J. Exp. Zool.*, **110**, 273-298.
- STENGER-HAFFEN (K.), 1955. — Sur les besoins nutritifs spécifiques des gonades de l'embryon de Poulet cultivées en milieux synthétiques. *C. R. Acad. des Sci.*, **240**, 1018-1019.
- TERROINE (E. F.), 1952. — La synthèse protéique. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- TROWELL (O. A.), 1955. — The culture of lymph nodes in synthetic media. *Exp. Cell. Res.*, **9**, 258-276.
- VENDRELY (R.), 1947. — Sur la détermination de quantités d'azote purique de l'ordre de 10-40 gammas. Application aux acides nucléiques, nucléo-protéides, tissus, microorganismes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 95-100.
- WAYMOUTH (C.), 1951. — Tissue culture media. I. Approaches to development of synthetic media for the animal cell. Analytic and supplementation methods. In Wisscher M. B. ed : *Methods in medical research*. Chicago. *The Year book publisher*, **4**, 201-206.
- WESTFALL (B. B.), PEPPERS (E. W.) et EARLE (W. R.), 1952. — A chromatographic investigation of the peptide and amino acid content of the protein-free ultrafiltrate from the serum and chick embryo extract. *Tissue Culture Association Abstr.*, **4**.
- WHITE (P. R.), 1946. — Cultivation of animal tissue *in vitro* in nutrients of precisely known constitution. *Growth*, **10**, 231-289.
- WOLFF (EM.), 1953. — Croissance et différenciation en milieux synthétiques de la syrinx de l'embryon de Poulet. Résultats préliminaires. *C. R. Soc. de Biol.*, **147**, 864-868.
- 1955. — Les besoins spécifiques en acides aminés de la syrinx de l'embryon de Poulet, cultivée *in vitro* sur un milieu entièrement synthétique. *C. R. Acad. des Sci.*, **240**, 1016-1017.
- 1957 a. — Nouvelles recherches sur la culture organotypique de la syrinx d'Oiseau. Culture sur différents milieux naturels et amélioration de ces milieux par des acides aminés. *Arch. Anat. micr. et Morph. exp.*, **46**, 1-38.

- 1957 b. — Analyse des besoins nutritifs d'un organe embryonnaire, la syrinx d'Oiseau, cultivée en milieu synthétique. *Arch. Anat. micr. et Morph. exp.*, **46**, 407-468.
- WOLFF (ET.), 1935 a. — Sur l'action de l'hormone ♂ (androstérone) injectée à l'embryon de Poulet. Production expérimentale d'intersexués. *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1312-1313.
- 1935 b. — Sur la transformation expérimentale des ♀ génétiques en intersexués, provoquée par l'injection d'hormone ♂ aux embryons de Poulet. *C. R. Acad. des Sci.*, **205**, 1055-1058.
- 1939. — L'action du diéthylstilbæstrol sur les organes génitaux de l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. des Sci.*, **208**, 1532-1533.
- 1946 a. — Sur la production expérimentale d'intersexués chez les Oiseaux, par la méthode des greffes embryonnaires. *C. R. Acad. des Sci.*, **223**, 212-214.
- 1946 b. — Recherches sur l'intersexualité produite par la méthode des greffes de gonades à l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. micr. et Morph. exp.*, **36**, 69-90.
- 1947. — Essai d'interprétation des résultats obtenus récemment chez les Vertébrés, sur l'intersexualité hormonale. *Experientia*, **7**, 272-276.
- 1948. — Recherches récentes sur l'intersexualité hormonale chez les embryons d'Oiseaux. *XIII^e Congrès Int. Zool., Paris*, 138-144.
- 1949. — La définition du type asexué chez l'embryon d'Oiseau. *C. R. Acad. des Sci.*, **229**, 248-250.
- 1950. — Le rôle des hormones embryonnaires dans la différenciation sexuelle des Oiseaux. *Arch. Anat. micr. et Morph. exp.*, **39**, 426-450.
- 1953. — Principe d'une méthode de culture d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *C. R. Soc. de Biol.*, **147**, 857-861.
- WOLFF (ET.) et GINGLINGER (A.), 1935 a. — Sur la production expérimentale d'intersexués par l'injection de folliculine à l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. des Sci.*, **209**, 2118-2121.
- 1935 b. — Caractères des intersexués obtenus expérimentalement chez l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. des Sci.*, **200**, 2221-2224.
- WOLFF (ET.) et HAFFEN (K.), 1951 a. — Sur la culture *in vitro* des glandes génitales des embryons d'Oiseaux : obtention de la différenciation sexuelle normale et de l'intersexualité expérimentale des gonades explantées. *C. R. Acad. des Sci.*, **233**, 439-441.
- 1951 b. — Sur les résultats de la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des Oiseaux. *C. R. Soc. de Biol.*, **145**, 1388-1391.
- 1952 a. — Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **10**, 463-472.
- 1952 b. — Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'Oiseau en culture *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **119**, 381-404.
- 1952 c. — Action féminisante de la gonade droite de l'embryon femelle de Canard en culture *in vitro*. *C. R. Soc. de Biol.*, **146**, 1772-1774.
- 1952 d. — Sur l'intersexualité expérimentale des gonades embryonnaires de Canard cultivées *in vitro*. *Arch. Anat. micr. et Morph. exp.*, **41**, 184-207.
- 1952 e. — Sur la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de l'embryon de Poulet en culture *in vitro*. *Ann. d'Endocrinol.*, **13**, 724-731.
- WOLFF (ET.), HAFFEN (K.), KIENY (M.) et WOLFF (EM.), 1953. — Essais de culture *in vitro* d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *J. Embr. exp. Morph.*, **1**, 55-84.
- WOLFF (ET.), HAFFEN (K.) et WOLFF (EM.), 1953. — Les besoins nutritifs des organes sexués embryonnaires en culture *in vitro*. *Ann. Nutr. Alim.*, **7**, 5-22.
- WOLFF (ET.), STRUDEL (G.) et WOLFF (EM.), 1948. — L'action des hormones androgènes sur la différenciation sexuelle des embryons de Poulet. *Arch. Anat. Histol. Embryol.*, **31**, 237-310.
- WOLFF (ET.) et WOLFF (EM.), 1946. — Action d'une substance œstrogène artificielle, l'acide n-bis-déhydrodoisynolique (sel de Na) racémique, sur l'appareil génital ♂ et ♀ de l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. de Biol.*, **142**, 700-702.
- WORZNAK (J. J.), 1952. — Carbohydrate as sources of energy for growth in tissue culture. *Tissue Culture Association, Annual meeting*.

Soulisse et Cassegrain, Imp., Niort. Dépôt légal : 2^e trim. 1958. N^o d'ordre : 395.

Masson et C^{ie}, Edit., Paris. Dépôt légal : 2^e trim. 1958. N^o d'ordre : 3007.

(Printed in France.)

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LA RÉGRESSION DU MÉSONÉPHROS CHEZ LES AMNIOTES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 9 juin 1957.

*Le Doyen
de la Faculté des Sciences,
J. PÉRÈS.*

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

*Le Recteur
de l'Académie de Paris,*

JEAN SARRAILH.

Printed in France.